



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“Efecto del cuerpo lúteo sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos y su posterior tolerancia a la criopreservación”

Tesis previa a la obtención del Título
de Médico Veterinario y Zootecnista.

AUTORES:

Milton Alejandro Tenemaza Cumbe CI: 0106845464
Shirley Lissette Merchán Vargas CI: 0105140453

DIRECTOR:

Dr. Manuel Elias Soria Parra CI: 1801620186

CUENCA-ECUADOR

13-05-2019



RESUMEN

Esta investigación se llevó a cabo para determinar el efecto del cuerpo lúteo sobre la tasa de clivaje de los ovocitos bovinos provenientes del Camal Municipal de Cuenca y su posterior competencia para desarrollarse a blastocistos y tolerar la criopreservación. Los ovarios se obtuvieron de vacas no preñadas, con un cuerpo lúteo (CL) en un ovario (ipsilateral, grupo 1, CCL) y sin CL en el ovario contralateral (grupo 2; SCL), y de vacas sin CL en los dos ovarios (control, grupo 3; C). Los complejos cúmulo-ovocitos (COC's) se categorizaron y se incluyeron únicamente los aptos (A y B) para la maduración por 18-24 horas. Los COC's fueron fecundados *in vitro* y los blastocistos obtenidos criopreservados mediante vitrificación o congelación. De los 348 ovarios procesados se obtuvieron 2532 ovocitos en 13 repeticiones, que, de acuerdo a la calidad, el 63,8% correspondieron a las categorías (A y B) aptos y el 36,2% a las (C y D) no aptos. La proporción de ovocitos AB fue mayor ($P < 0,05$) en CCL (66,6%) que en SCL (61,9%) y C (62,7%). Una mayor proporción de ovocitos del grupo CCL clivaron en comparación a los SCL y C (68,3 versus 43,8 y 46,6% respectivamente; $P < 0,01$). Asimismo, se obtuvo una mayor proporción de embriones totales en CCL (39,0%) que en SCL (29,2%) y C (29,8%) ($P < 0,05$). De los embriones clivados, un porcentaje mayor ($P < 0,01$) de embriones alcanzaron el estado de blastocistos en el día 7, y fueron criopreservados, en el grupo CCL (68,2%) que en SCL (39,8%) y C (38,7%). La sobrevida embrionaria luego de la vitrificación o congelación determinada a las 2, 24 y 48 horas fue estadísticamente similar entre los tres grupos de estudio. Se concluye que la presencia de un cuerpo lúteo en el ovario al momento de recuperarse los ovocitos afectó el porcentaje de clivaje y de producción de embriones en el día 7, pero no influenció la criotolerancia de los blastocistos. Además, según los resultados se presumen que el efecto del cuerpo lúteo fue por mecanismos locales.

Palabras clave: Cuerpo lúteo, Ovocitos, Blastocistos, Fecundación *in vitro*, Vitrificación y Congelación de embriones.



ABSTRACT

This research was conducted to determine the effect of the corpus luteum on the rate of cleavage of bovine oocytes and the subsequent competence to develop to blastocysts and to tolerate the cryopreservation. The ovaries selected for this study were recovered from the municipal slaughterhouse of Cuenca, from non-pregnant cows with a corpus luteum (CCL) in one ovary (ipsilateral, group 1, CCL) and without CL in the contralateral ovary (group 2; SCL), and of cows without CL in both ovaries (control, group 3; C). The cumulus-oocyte complexes (COCs) were categorized and only those with apt (A and B) quality were included for maturation for 18-24 hours. The COCs were fertilized in vitro and the blastocysts obtained were cryopreserved by vitrification or freezing. From 348 ovaries, 2532 oocytes were obtained in 13 replicates, which, according to quality, 63.8% corresponded to categories (A and B) apt and 36.2% to (C and D) not apt. The proportion of AB oocytes was greater ($P < 0.05$) in CCL (66.6%) than in SCL (61.9%) and C (62.7%). A greater proportion of oocytes from the CCL group cleaved in comparison to the SCL and C (68.3 versus 43.8 and 46.6% respectively; $P < 0.01$). Likewise, a greater proportion of total embryos was obtained in CCL (39.0%) than in SCL (29.2%) and C (29.8%) ($P < 0.05$). From the total of clivated embryos, a greater percentage ($P < 0.01$) of embryos attained the blastocyst stage on day 7 and were cryopreserved, in the CCL group (68.2%) than in SCL (39.8%) and C (38.7%). Embryonic survival after vitrification or freezing determined at 2, 24 and 48 hours was statistically similar among the three study groups. General, the presence of a corpus luteum in the ovary at the time of recovering the oocytes affected the percentage of cleavage and embryo production on day 7, but did not influence the cryotolerance of the blastocysts. In addition, according to these results it is presumed that the effect of the corpus luteum occurred through local mechanisms.

Keywords: Corpus luteum, Oocytes, Blastocyst, *In vitro* fecundation, Embryo vitrification and Freezing.



ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	15
1.1 OBJETIVOS	17
1.1.1 Objetivo General	17
1.1.2 Objetivos Específicos	17
1.2 HIPÓTESIS	17
2. REVISION DE LITERATURA	18
2.1 Aparato Reproductor de la Hembra Bovina	18
2.2 El ciclo estral bovino	18
2.2.1 Fase Folicular o Proestro	19
2.2.2 Fase periovulatoria (estro y metaestro)	20
2.2.3 Fase luteal y diestro	21
2.3 Dinámica Folicular	23
2.4 Los ovarios de la hembra bovina	24
2.4.1 Anatomía y función	24
2.4.2 Ovogénesis	24
2.4.3 Foliculogénesis	25
2.4.4 Folículos Ováricos	25
2.5 Categorías de folículos ováricos	26
2.5.1 Folículos primordiales	26
2.5.2 Folículos primarios	26
2.5.3 Folículos Secundarios	26
2.5.4 Folículos terciarios o de Graaf	27
2.5.5 Luteinización	27
2.5.6 Cuerpo Lúteo	28



2.6 Progesterona	31
2.7 Biotecnologías reproductivas	32
2.7.1 Producción <i>in vitro</i> de embriones	32
2.7.2 Conservación de embriones	33
2.7.3 Criopreservación de embriones.....	34
2.8 Técnicas de Criopreservación.....	35
2.8.1 Congelación lenta.....	36
2.8.2 Vitricación de embriones	37
2.9 Vitricación frente a la congelación.....	38
2.10 Evaluación de embriones después de la descongelación.....	40
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
3.1 Materiales	40
3.1.1 Recursos materiales disponibles	40
3.1.2 Recursos materiales requeridos.....	41
3.1.3 Área de estudio	42
3.2 Métodos	42
3.3 Unidad experimental	42
3.4 Diseño experimental	43
3.4.1 Análisis estadístico	43
3.5 Variables en estudio.....	43
3.6 Metodología	44
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
4.1. Resultados	53
4.1.1 Calidad de ovocitos	53
4.1.2 Tasa de clivaje y producción de embriones.....	54
4.1.3 Criotolerancia embrionaria	55



4.2. Discusión	59
4.2.1 Evaluación de la calidad ovocitaria.....	59
4.2.2. Evaluación de las tasas de clivaje y de producción de embriones	61
4.2.3. Evaluación de la criotolerancia embrionaria	62
5. CONCLUSIONES	65
6. BIBLIOGRAFÍA	66
7. ANEXOS	75
Anexo 1: Recolección de ovarios bovinos en el camal municipal de Cuenca.	75
Anexo 2: Lavado de ovarios con SF y ovarios con presencia de CL	75
Anexo 3: Ovarios con CL y sin CL (control); pesaje del ovario	76
Anexo 4: Punción de folículos y pesaje del cuerpo lúteo	76
Anexo 5: Búsqueda de ovocitos y categoría de ovocitos.....	77
Anexo 6: Columnas de Percoll para la FIV y denudado de ovocitos.....	77
Anexo 7: Clivaje de embriones y vitrificación de embriones	78
Anexo 8: Embriones desvitrificados grupo con CCL y tinción con fluorocromos..	78



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características del cuerpo lúteo de acuerdo al ciclo estral,	22
Tabla 2. Número de ovocitos, tasas de clivaje, de embriones en el día 7 y de blastocitos criopreservados de acuerdo a la presencia (CCL) o no (SCC, C) de un cuerpo lúteo en el ovario al momento de la colecta de ovocitos.....	54
Tabla 3. Tasa de expansión de blastocistos vitrificados a las 2 horas (h), y de expansión y protrusión a las 24 y 48 h luego de su calentamiento de acuerdo a la presencia (CCL) o no (SCC, C) de un cuerpo lúteo en el ovario al momento de la colecta de ovocitos.....	56
Tabla 4. Tasa de expansión de blastocistos descongelados a las 2 horas (h), y de expansión y protrusión a las 24 y 48 h luego de su descongelación de acuerdo a la presencia (CCL) o no (SCC, C) de un cuerpo lúteo en el ovario al momento de la colecta de ovocitos...	56
Tabla 5. Tasa de expansión de blastocistos criopreservados a las 2 horas (h), y de expansión y protrusión a las 24 y 48 h luego de su calentamiento/descongelación de acuerdo a la presencia (CCL) o no (SCC, C) de un cuerpo lúteo en el ovario al momento de la colecta de ovocitos.	57
Tabla 6. Número de células totales, y número y proporción de células alteradas a las 48 horas luego del calentamiento de blastocistos vitrificados de acuerdo a la presencia (CCL) o no (SCC, C) de un cuerpo lúteo en el ovario al momento de la colecta de ovocitos.	57
Tabla 7. Número de células totales, y número y proporción de células alteradas a las 48 horas luego de la descongelación de blastocistos de acuerdo a la presencia (CCL) o no (SCC, C) de un cuerpo lúteo en el ovario al momento de la colecta de ovocitos.	57
Tabla 8. Número de células totales, y número y proporción de células alteradas a las 48 horas luego de la descongelación o el calentamiento de blastocistos de acuerdo a la presencia (CCL) o no (SCC, C) de un cuerpo lúteo en el ovario al momento de la colecta de ovocitos.	58
Tabla 9. Número de células totales, y número y proporción de células alteradas a las 48 horas luego de la descongelación de blastocistos de acuerdo a la presencia (CCL) o no (SCC, C) de un cuerpo lúteo en el ovario al momento de la colecta de ovocitos.	58



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aparato reproductor de la vaca.....	18
Figura 2. Dinámica Folicular en vaca con dos ondas.	23
Figura 3. Envasado de los embriones para la congelación.	35
Figura 4. Envasado de los embriones para la vitrificación.	38
Figura 5. Ubicación de la granja de Irquis.....	42
Figura 6. Punción y aspiración folicular.	45
Figura 7. Clasificación por la calidad de COCs.	46
Figura 8. Maduración de COCs, en el laboratorio.	47
Figura 9. Pasaje de semen a través de las columnas de Percoll.	48
Figura 10. Estadios de desarrollo embrionarios en bovinos, transferibles al día 7.	49
Figura 11. Estadios de embriones encontrados.	49
Figura 12. Catéter Tom Cat usado para vitrificar embriones.....	50
Figura 13. Esquema para la congelación de embriones en pajillas de inseminación	51
Figura 14. Proporción de ovocitos de calidades AB y CD de acuerdo a la presencia (CCL) o no (SCC, C) de un cuerpo lúteo en el ovario al momento de la colecta (^{a, b} P<0.05).	54
Figura 15. Estadio de embriones expresados por porcentaje (%) con presencia de (M: mórulas; BT: blastocistos tempranos; B: blastocistos; BE: blastocistos expandidos; BP: blastocistos protruidos) de acuerdo a la presencia (CCL) o no (SCC, C) de un cuerpo lúteo en el ovario al momento de la colecta de ovocitos (^{a, b} P<0,01, ^{b, c} P<0,01).	55



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Shirley Lissette Merchán Vargas en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Efecto del cuerpo lúteo sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos y su posterior tolerancia a la criopreservación”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 13 de mayo del 2019

Shirley Lissette Merchán Vargas

C.I: 0105140453



Cláusula de Propiedad Intelectual

Shirley Lissette Merchán Vargas, autor/a del trabajo de titulación "Efecto del cuerpo lúteo sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos y su posterior tolerancia a la criopreservación", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 13 de mayo del 2019

Shirley Lissette Merchán Vargas

C.I: 0105140453



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Milton Alejandro Tenemaza Cumbe en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Efecto del cuerpo lúteo sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos y su posterior tolerancia a la criopreservación", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 13 de mayo del 2019

Milton Alejandro Tenemaza Cumbe

C.I: 0106845464



Cláusula de Propiedad Intelectual

Milton Alejandro Tenemaza Cumbe, autor/a del trabajo de titulación "Efecto del cuerpo lúteo sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos y su posterior tolerancia a la criopreservación", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 13 de mayo del 2019

Milton Alejandro Tenemaza Cumbe

C.I: 0106845464

AGRADECIMIENTO



Agradecemos a Dios por ser nuestra guía y fortaleza durante esta gran etapa, por brindarnos una vida llena de salud y prosperidad.

Al Dr. PhD, Fernando Perea, quien un excelente formador académico supo apoyarnos en todo momento de la realización de esta tesis y de igual manera al Dr. Daniel Argudo, por brindarnos su tiempo y su ayuda en el laboratorio sin egoísmo y sin ver la razón social de los estudiantes, quienes con su paciencia, dedicación y profesionalismo compartieron ese tiempo para poder aprender de ellos y formarnos de manera profesional.

A la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad estatal de Cuenca, por habernos permitido iniciar y finalizar uno de nuestros grandes sueños de ser excelentes profesionales y de pertenecer a tan preciada institución.

Milton Alejandro Tenemaza Cumbe

Shirley Lissette Merchán Vargas

DEDICATORIA



A mi madre María Elena Vargas Espinoza por ser una mujer luchadora y por haberme criado en mi infancia y adolescencia en donde quiera que ella este siempre será una mujer maravillosa.

A mi hermano Jhonny Merchán por darme su techo cuando comenzó mis estudios y por no darme la espalda cuando estuvimos solos y a mi pequeño hermano Carlos Baculima por ser ese motivo de lucha para lograr mis metas y ser una gran profesional.

A mi gran amiga Elsa Jara por darme sus consejos y valores que una mujer necesita ella creen mí y me valora con todos mis defectos.

A mi tía Carmita Obaco quien estuvo en el inicio de mi vida universitaria dándome su apoyo siendo como una madre en ese momento cuando nadie lo estaba y por querernos a mí y a mis hermanos.

A mi amigo, compañero y novio Milton Tenemaza por brindarme todo su apoyo en estos dos años de estudio y su cariño incondicional luchando por llegar lejos profesionalmente y cumpliendo sueños y por tenerme paciencia en este largo camino de la investigación.

Shirley Lissette Merchán Vargas

DEDICATORIA



A mi abuelita María Zoila Cumbe quien con una gran responsabilidad que yo le implicaba, supo con mucho esfuerzo, ser cómplice de gran parte de mi vida, desde mi infancia, adolescencia y mi madurez, como siempre ella preocupada de mi bienestar, logramos salir adelante en cualquier circunstancia que se presentó a lo largo de nuestras vidas.

A mi abuelito Julio Vicente Tenemaza quien con su carácter y ejemplo hicieron de mí un hombre de bien, y así sus consejos sabios me enseñaron que la educación es el mejor legado que nos pueden dar en esta vida, me enseñó que luchar con responsabilidad y esfuerzo a la final siempre se tiene una recompensa.

A mi madre por haberme regalado esta vida tan preciada, a pesar de no haber estado conmigo es mi pilar esencial para cumplir mis sueños desde pequeño.

A mis tíos, Oscar, Vicente, Libia, Luis, Serafín y Cristina quienes me vieron crecer y ser para mí una fuente importante de apoyo incondicional ya que ellos son mi mayor admiración de superación y sacrificio personal a cualquier parte donde vayamos.

A mi cómplice, amiga y compañera de tesis Shirley Merchán, quien con su actitud, constancia y perseverancia me ha echo ser su principal admirador, me ha enseñado a triunfar a pesar de las adversidades que existen en la vida. Gracias amada mía, por permitir ser parte de tu vida.

Milton Alejandro Tenemaza Cumbe



1. INTRODUCCIÓN

Actualmente las biotecnologías reproductivas son de mucho interés en las explotaciones pecuarias, y gracias a su amplia difusión e incipiente aplicación en nuestro país, hay expectativas de grandes avances en la reproducción de los hatos ganaderos. Entre las biotecnologías reproductivas, la que ha tenido mucho auge a nivel mundial en los últimos años es la producción *in vitro* de embriones que implica varias etapas: la maduración (MIV) y fecundación (FIV) *in vitro* de ovocitos, y el cultivo (CIV) *in vitro* de embriones.

Estas etapas están sujetas a numerosos factores que pueden influenciarlas y modificar la efectividad con la que se obtiene el producto final, los blastocistos. La producción de embriones derivados de la fecundación *in vitro* es baja en la actualidad, pudiendo estar más relacionada con la fuente de ovocitos y del medio ambiente fisiológico del animal del cual estos son obtenidos que de las condiciones de la maduración, la FIV o el cultivo *in vitro* (1).

El cuerpo lúteo es una estructura ovárica de gran importancia para garantizar la gestación y la consecución de los ciclos reproductivos. Sin duda, su presencia juega un rol fundamental en la actividad funcional del ovario. Así, un conjunto de evidencias ha demostrado que el cuerpo lúteo, o el principal producto de su actividad endocrina, la progesterona, influencia la capacidad de desarrollo de los ovocitos y la subsecuente producción de embriones (2)(3)(4).

Un estudio demostró que en novillas que poseen un cuerpo lúteo activo o funcional se recuperaron mayor número de ovocitos (3); además, se reportó que la presencia de un cuerpo lúteo en los ovarios de vacas Holstein al momento de recuperarse los ovarios (vacas en fase luteal) incrementó el número de ovocitos de calidades A y B frente a las que no tenían estructura luteal o estaban en fase folicular ($10,87 \pm 1,01$ versus $7,05 \pm 0,11$ ovocitos respectivamente; $P < 0,001$) (4).

Además, una mayor proporción de blastocistos se desarrollaron más rápidamente a partir de ovocitos bovinos recolectados de vacas sacrificadas en los días 14 a 16 del ciclo estral que en etapas anteriores y posteriores (2). Asimismo, en búfalas, se logró una mayor tasa de clivaje y producción de blastocistos transferibles a partir de ovocitos



recuperados de ovarios que tienen un cuerpo hemorrágico o una CL sin folículos dominantes en el mismo ovario (5).

Aun así, existen discrepancias sobre los efectos positivos y negativos del cuerpo lúteo en los parámetros reproductivos y el potencial de desarrollo de los ovocitos; además, otros factores que influyen en la capacidad de desarrollo de los ovocitos es el tamaño de los folículos donde se obtienen (6).

En base a los hallazgos expuestos en los párrafos precedentes, el desarrollo de esta investigación pretendió demostrar el efecto del cuerpo lúteo sobre la capacidad de los ovocitos para clivar, desarrollarse al estado de blastocistos y tolerar la criopreservación, determinándose a la vez si este efecto ocurría por igual en el ovario ipsilateral y contralateral al ovario que contenía el cuerpo lúteo o, por el contrario, si este efecto era local y obedecía a interacciones intraováricas.



1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo General

Determinar si la presencia de un cuerpo lúteo en el ovario de donde se obtienen los ovocitos afecta la producción *in vitro* de embriones bovinos y su posterior capacidad para tolerar la criopreservación.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto del cuerpo lúteo sobre la tasa de clivaje de ovocitos bovinos obtenidos de camal luego de la fecundación *in vitro*.
- Determinar el efecto del cuerpo lúteo sobre el desarrollo *in vitro* de embriones bovinos hasta el estado de blastocistos.
- Determinar si la presencia de un cuerpo lúteo influye sobre la capacidad de los embriones bovinos producidos *in vitro* para tolerar la criopreservación.

1.2 HIPÓTESIS

La presencia de un cuerpo lúteo activo afecta las características funcionales y morfológicas de los ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Aparato Reproductor de la Hembra Bovina

El aparato reproductor de la hembra bovina, está constituida por dos ovarios y un sistema de conductos femeninos. Los ovarios son estructuras más importantes y complejas del tracto reproductor de la vaca, debido a que interactúan con otras glándulas y estructuras nerviosas para controlar el ciclo reproductivo; es el sitio donde se produce los ovocitos y las hormonas sexuales femeninas como los estrógenos y la progesterona. El sistema de conductos está formado por oviductos, útero, cérvix, vagina y vulva, como se puede ver en la Figura 1, es muy importante conocer la anatomía debido a que se tiene que atravesar todas las estructuras mencionadas para llegar al sitio de estudio (ovarios) (7).

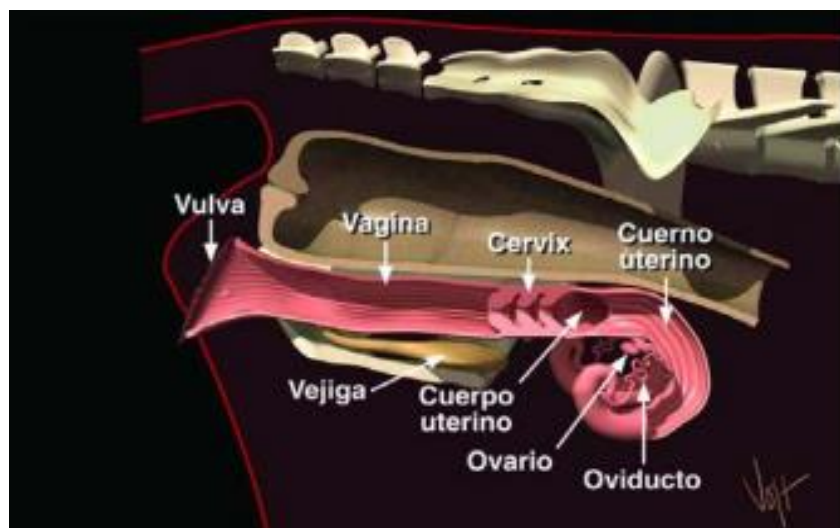


Figura 1. Aparato reproductor de la vaca

Fuente: (8).

2.2 El ciclo estral bovino

El ciclo estral comprende un patrón cíclico que empieza en un celo y termina en el siguiente celo, permitiendo de esta manera un apareamiento y la subsecuente gestación de la hembra bovina (9). En la hembra bovina inicia al momento de la pubertad, y se detiene solamente al momento de la gestación o desbalance energético negativo. El ciclo estral se caracteriza por un crecimiento y regresión de folículos y



cuerpo lúteo, en un promedio de 21 días, aunque puede haber variación entre 17 a 24 días dependiendo del número de ondas foliculares que presente en el ovario del animal.

El ciclo estral esta subdividido en dos fases dependiendo de la hormona dominante, o en la estructura ovárica presente en cada fase. La fase luteínica empieza con la formación de un CL funcional, 5 a 6 días después del celo, y termina cuando este entra en regresión a los 17 o 19 días del ciclo. Durante esta fase los niveles de progesterona son altos y los estrógenos bajos. La fase que sigue es la folicular, que inicia cuando el CL de un ciclo entra en regresión y termina con la ovulación, por lo tanto, esta fase abarca el periodo de celo, durante el cual los niveles de estrógenos están altos y los de progesterona bajos. Las dos fases no impiden la presencia de folículos e los ovarios, del mismo modo estudios han demostrado que la aparición y desarrollo de folículos en los ovarios ocurre en ondas de crecimiento, que durante el ciclo estrual de la vaca pueden variar entre 2 a 3 en 21 días (8).

El ciclo estral de la vaca está controlado por mecanismos endocrinos y neuroendocrinos en el cual intervienen el sistema nervioso, algunos órganos y varias hormonas producidas en el hipotálamo, la hipófisis, el útero y los ovarios. Los folículos se desarrollan continuamente en los ovarios gracias a la influencia de la hormona folículo estimulante (FSH) producida en la hipófisis, y esta a su vez es controlada por la hormona liberadora de gonadotrofina (GnRH) producida por el hipotálamo (10). El ciclo estral se divide en cuatro fases bien definidas, que son: proestro, estro, metaestro y diestro, presentándose características funcionales importantes en cada fase, como se describe a continuación:

2.2.1 Fase Folicular o Proestro

Esta fase inicia con la regresión del cuerpo lúteo del ciclo anterior y termina con el inicio del estro, celo o calor, que en la vaca dura entre 12 y 18 horas. La regresión del CL ocurre por la acción de la prostaglandina F2alfa ($PGF_{2\alpha}$) de origen uterino, que inicia el proceso de luteólisis y través de una sucesión de eventos moleculares conduce a la destrucción funcional y estructural del CL. Con la caída de la progesterona, el efecto de la retro alimentación negativa que esta ejercía sobre el



hipotálamo desaparece, y como consecuencia, el número y amplitud de los pulso de LH se incrementan, lo cual estimula el crecimiento y maduración del folículo dominante que alcanza el estatus ovulatorio (11).

La FSH provoca la emergencia de ondas foliculares; una onda folicular consiste en el desarrollo de varios folículos de manera simultánea, y en cada onda uno de estos folículos se desarrolla más y se hace dominante, provocando la regresión o atresia de sus compañeros (folículos subordinados). Se considera que un folículo es dominante cuando supera los 8,5 mm de diámetro. Por lo general, en el proestro ya existe un folículo dominante con apariencia de una vesícula llena de líquido contiene el ovocito que será ovulado posteriormente. Además, este folículo es estimulado por las hormona FSH y LH para producir estrógenos, que se incrementaran progresivamente y alcanzaran los centros nerviosos del hipotálamo que controla las manifestaciones externas del celo, que es parte de la siguiente fase (12).

2.2.2 Fase periovulatoria (estro y metaestro)

El estro es el periodo de receptividad sexual de la vaca, y durante este lapso de tiempo el animal se deja montar por el toro y otras vacas, esta fase involucra todos los cambios que conllevan a la ovulación y el comienzo de la formación del CL. Entre los signos principales están la inflamación de la vulva, secreción del moco claro y transparente que sale por la vulva, el olor del moco el que atrae al toro por la producción a las feromonas (13).

La duración del celo es variable, pero se considera un promedio de 16 ± 4 . Los signos del celo se producen gracias a la presencia de estrógenos provenientes del folículo. La alta concentración de estrógenos afecta también a centros endocrinos en el hipotálamo que controla la liberación de GnRH, y esta a su vez la liberación de LH y FSH de la adenohipófisis.

La descarga ovulatoria de LH/FSH ocurre antes de la ovulación, y la LH es considerada la gonadotropina primaria responsable de la misma, sin embargo, la FSH también ha alcanzado niveles máximos y es también causante de la ovulación y de formación del tejido luteal. Los niveles de FSH se incrementan en mayor medida unas



horas después del pico de LH, y este aumento está asociado con el inicio de la primera onda folicular de la dinámica folicular (11).

Después de las 12 a 24 horas el sistema nervioso central se hace refractario a los estrógenos y entonces los signos del celo se desaparecen y se inicia la siguiente fase, el metaestro, que dura de 3 a 5 días. En esta fase ocurre la ovulación en la vaca, que tiene lugar de 28 a 30 horas de iniciado el celo. Después de la ovulación se produce una hemorragia y el folículo se llena de sangre, convirtiéndose en una estructura conocida como cuerpo hemorrágico, posteriormente las células foliculares (granulosa y teca interna) se transforman en células luteales grandes y pequeñas; estos cambios ocurren entre los días 2 y 5 del ciclo y finaliza cuando comienza la fase luteal activa o diestro (10).

2.2.3 Fase luteal y diestro

Como se mencionó anteriormente después de la ovulación, en el lugar donde antes estuvo el folículo, queda una fosa. Allí los restos del folículo sufren cambios importantes por influencia de la LH y se forma el cuerpo lúteo. Por lo tanto, esta fase tiene dominio del CL y se extiende desde el día 5 al día 18 del ciclo estral; durante esta el CL produce cantidades elevadas de progesterona, la misma que inhibe la producción de GnRH en el hipotálamo y reduce la liberación de la LH en la hipófisis, lo cual evita nuevas ovulaciones (14).

Asimismo, la progesterona también actúa sobre el endometrio para favorecer la anidación del embrión y mantener la gestación (12). En el CL el mayor flujo sanguíneo proviene del ovario y la calidad del flujo recibido está altamente relacionado con la cantidad de progesterona producida y secretada (11). Los niveles de progesterona más altos alcanzan en el día 10 del ciclo y se mantienen hasta el día 16 a 18 del ciclo dependiendo de la presencia o no de un embrión.

En un estudio realizado por Ireland 1980 se dividió el ciclo estral en 4 etapas con sus días correspondientes con la finalidad de dar una explicación más clara acerca de las características morfológicas del CL y la correspondiente concentración de progesterona de acuerdo a los días del ciclo como se aprecia en el Tabla 1 (15).

Tabla 1. Características del cuerpo lúteo de acuerdo al ciclo estral,

Fuente: Ireland *et al.*, (1980)

Características del cuerpo lúteo	Estadio del ciclo estral			
	I	II	III	IV
Nro. animales	30	42	52	22
Días del ciclo	1-4	5-10	11-17	18-20
Concentración P4 (ng/ml)	1.5	6.9	7.8	1.2
Peso	0.8	3.4	3.6	1.3
Diámetro (cm)	0.5-1.5	1.6-2.0	1.6-2.0	<1.0
Apariencia externa	Rojo, recientemente ovulado, punto de ruptura no cubierto por epitelio	Punto de ruptura cubierto, ápice del CL rojo o marrón	Color canela o naranja	Amarillo, amarillo pálido
Apariencia interna	Rojo, con frecuencia lleno de sangre, el tejido se aprecia laxo (suelto)	Rojo o marrón solo en el ápice, el resto del CL es de color marrón	Color naranja	Anaranjado a amarillo
Vasculatura en la superficie del CL	No visible	Generalmente limitada a la periferia	Igual que el estadio II pero abarcara también el ápice del CL al final de este estadio	No visible

Cuando la vaca no se preño el cuerpo lúteo es inducido a degenerar por la acción de la $\text{PGF}_{2\alpha}$. Con la ausencia del embrión las señales químicas consiguen el incremento de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ en la parte final de la fase luteal o diestro y el reinicio del proestro o fase del CL (11)

2.3 Dinámica Folicular

Se entiende por dinámica folicular al proceso del crecimiento y regresión de folículos en el ovario, que conlleva al desarrollo de un solo folículo preovulatorio, tal como se observa en el Gráfico 2. (13). En vacas tanto adultas como en jóvenes el desarrollo de folículos se desarrolla en forma de ondas, solamente se detiene en los últimos 30 días de gestación, durante el posparto y el estro. Existe entre 1 y 4 ondas de crecimiento y desarrollo folicular, y el folículo preovulatorio se desarrolla a partir de la última onda (11).

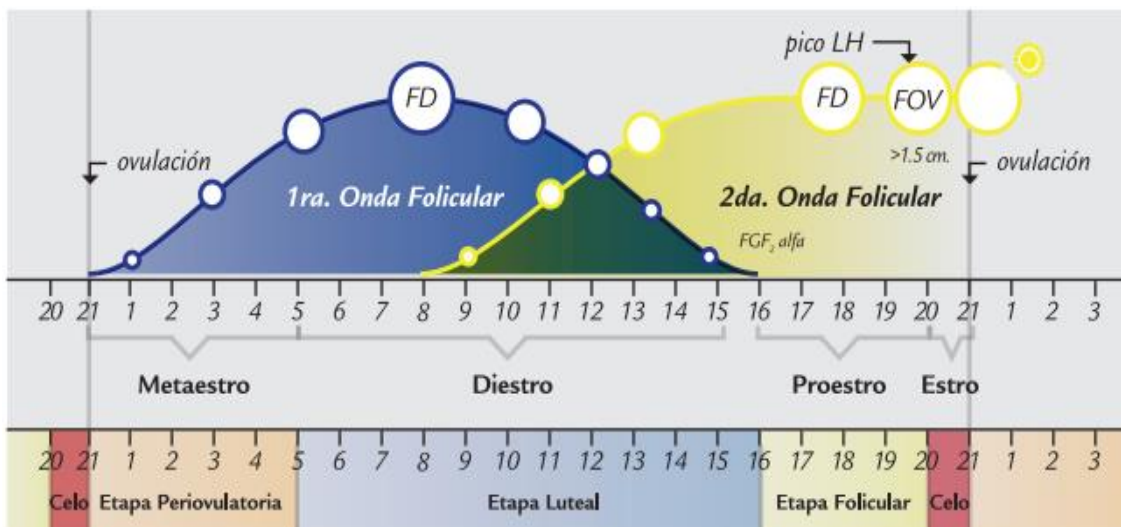


Figura 2. Dinámica Folicular en vaca con dos ondas.

Fuente: (12)

Los folículos que se desarrollan en las vacas tienen 3 estados bien definidos que son: reclutamiento, selección y dominancia. Cada uno se define a continuación:

- **Reclutamiento:** es un proceso por el cual un grupo de folículos inician su maduración en un medio con un aporte adecuado de gonadotropinas que le permite avanzar a la ovulación (16).
- **Selección:** Es el proceso en que uno o varios folículos son elegidos y evitan la atresia con la posibilidad de llegar a la ovulación, estos tienen un tamaño promedio de 6 a 9 mm.
- **Dominancia:** Es el proceso por el cual el folículo seleccionado domina a los demás de su cohorte, y, además, posee un efecto inhibitorio sobre



reclutamiento de un nuevo grupo de folículos. Este folículo alcanza un tamaño superior a los demás, es el responsable de la mayor secreción de estradiol y adquiere la capacidad de seguir su crecimiento en un medio hormonal adverso para los demás folículos. La causa para que haya regresión del folículo dominante, luego de varias horas en tal estado es la presencia de un patrón de secreción de LH caracterizado por bajos pulsos de LH, debido a la supresión de esta gonadotropina por los altos niveles de progesterona.

- **Atresia:** Los folículos subordinados que no alcanzaron el estado de dominancia inician el proceso de atresia o regresión folicular mediante apoptosis celular, que es mecanismo de homeostasis tisular. De igual manera, la atresia ocurre en los folículos dominantes que no logran el estatus ovulatorio, y la causa para que el folículo dominante entre en regresión sería la baja frecuencia de pulsos del LH, debido a la presencia de progesterona (17).

2.4 Los ovarios de la hembra bovina

2.4.1 Anatomía y función

Los ovarios son órganos esenciales de aparato reproductor de la hembra. Tiene dos funciones: formación de gametos (ovogénesis) y otra endocrina: síntesis de estrógenos y progesterona en el cuerpo lúteo o amarillo, durante los distintos estadios del ciclo estral. Los ovarios en la vaca entran en actividad al momento de la pubertad, bajo la influencia de las hormonas gonadotróficas de la adenohipófisis. Desde ese momento los ovarios cumplen con una gran cantidad de fenómenos cíclicos (maduración de los folículos ováricos).

2.4.2 Ovogénesis

En la función productora de óvulos se sucede lo siguientes eventos; durante el periodo fetal en el epitelio germinativo del esbozo ovárico se generan células que quedan incluidas en su interior. Estas células posteriormente sufrirán divisiones para dar lugar a los folículos primordiales, al nacer una hembra puede poseer más o menos entre 100.000 a 2.000.000 folículos en su ovario. Pero la mayoría de estos folículos sufrirán atresia y solo unos miles madurarán para cumplir con la función reproductora (18).



Es el proceso de formación y desarrollo de la célula sexual de la hembra comienza en la vida fetal con una división mitótica de las ovogonias, dado que en un inicio estas células se transforman en ovocitos y comienza el proceso de la meiosis, el cual da lugar a una célula haploide capaz de ser fecundada (ovocito). Posterior a la meiosis I, los ovocitos se rodean de células foliculares y el proceso meiótico se detiene en estado de diploteno de la profase I, ovocito I, conocido como estado dictiático. La meiosis continúa luego del pico preovulatorio de la LH solo en los folículos ovulatorios, y avanza hasta la metafase II. Cuando el ovocito es fecundado se reanuda y culmina la meiosis II, con la formación del ovocito maduro y el segundo corpúsculo polar (1).

2.4.3 Foliculogénesis

Al igual que la ovogénesis comienza en la vida fetal, a través de la foliculogénesis se constituye la reserva de folículos primordiales (1). Estos folículos primordiales se forman antes o en los primeros días de nacimiento, y dan origen a los folículos primarios que posteriormente se convertirán en folículos primarios, luego secundarios y preantrales, y poco después en antrales y finalmente en folículos maduros o de Graff, todo este crecimiento y diferenciación se denomina foliculogénesis (19).

Los folículos primordiales progresan a través de las fases de reclutamiento, selección, crecimiento y diferenciación en un proceso aparentemente continuo e irreversible, bajo la influencia de la hormona folículo estimulante (FSH), a partir de allí esta hormona provoca un fenómeno conocido como ondas foliculares descritas anteriormente (12). Cuando un folículo primordial entra en crecimiento, este será conducido a dos caminos: la degeneración por atresia o la ovulación (20).

2.4.4 Folículos Ováricos

Una de las unidades estructurales y funcionales del ovario de la vaca son los folículos; su crecimiento, desarrollo y maduración es un proceso fundamental para una alta eficiencia productiva en la ganadería, sobre todo por el ovocito que contiene, ya que este dará lugar a un embrión luego de su fecundación (21) y aun cuerpo lúteo funcional luego de la ovulación.



Los folículos son estructuras llenas de fluido que en su interior contienen ovocitos en desarrollo, usualmente se puede encontrar varios folículos de tamaños variables en cada ovario (8).

2.5 Categorías de folículos ováricos

2.5.1 Folículos primordiales

Están constituidos por un ovocito rodeado de una sola capa de células epiteliales, solamente unos pocos de estos pasan a las fases de desarrollo posterior. Durante este estadio los folículos permanecen en una fase de reposo, o en un estado de inactividad o aquiescencia, durante largos periodos sin experimentar signos de desarrollo. Su número comienza a descender a partir del nacimiento, o al final de la vida sexual (18).

Estos folículos tienen un diámetro menor a 0.4 mm con un ovocito localizado en la parte central, a partir de este folículo inicia el crecimiento y maduración folicular (22).

2.5.2 Folículos primarios

Se caracteriza porque ocurre un cambio significativo cuando las células aplanadas que rodean al oocito aumentan su tamaño hacia una forma cuboidal, crecen hasta los 0,80 mm de diámetro y se consolida como una estructura con un oocito de un diámetro superior a 0,3 mm y una capa de 25–40 células cuboidales llamadas células de la granulosa. Sobresale el aumento del volumen del oocito y la formación de la zona pelúcida (22).

2.5.3 Folículos Secundarios

Tal como se mencionó están en crecimiento y rebasan la etapa inactiva e inician su desarrollo en respuesta a la hormona foliculoestimulante, estos folículos provienen de la división de las células epiteliales periféricas que cercaban al folículo primario y que posteriormente se rodean de dos o más capas de células foliculares. En la pubertad puede encontrarse hasta 200 en un ovario (18). El tamaño de estos folículos varía entre 4 a 8 mm de diámetro.



2.5.4 Folículos terciarios o de Graaf

Son folículos que provienen de la maduración de los folículos secundarios, que llegan a ese estadio únicamente a partir de la pubertad, bajo la estimulación de la hormona de la adenohipófisis. Posee varias capas de células de la granulosa, las más internas que tapizan internamente la pared del folículo se consideran la capa mural y tienen como función fundamental segregar líquido folicular. El ovocito está ubicado más o menos en el centro del folículo y está rodeado por varias capas de células de la granulosa, el cúmulo ooforo, que interactúan con el ovocito (18). El tamaño de estos folículos es superior a 8 mm.

2.5.4.1 Líquido Folicular

Se origina principalmente del plasma periférico por trasudación a través de la lámina basal del folículo y se acumula en el antro, este trasudado sérico es modificado por actividades metabólicas foliculares que contiene esteroides y glucoproteínas sintetizadas por las células de la pared folicular (23).

2.5.5 Luteinización

Anteriormente se describió que el folículo está compuesto de dos tipos de células: de la teca y de la granulosa; poco antes de la ovulación, durante el pico de la LH-FSH, estas últimas recubren el folículo preovulatorio y adquieren la capacidad de producir progesterona a partir del colesterol y pierden la capacidad de producir estrógenos debido a la inhibición de la enzima aromatasa. Este fenómeno de diferenciación celular se conoce como luteinización. Luego de la ovulación se forma el cuerpo lúteo, a partir de la hipertrofia de las células de la granulosa y de la teca que por su cambio morfológico se denominan células luteales grandes y pequeñas, respectivamente (24). Este proceso consiste en todos los cambios morfológicos, endocrinos y enzimáticos que ocurren en el folículo preovulatorio hasta que este se transforma en un cuerpo lúteo funcional (25)

La luteinización comienza antes de la ovulación en respuesta a la elevación preovulatoria de las gonadotropinas (LH y FSH), siendo la LH la hormona más importante para la ruptura del folículo y posterior transformación de una estructura



lútea. La ovulación ocurre en promedio de 30H después del pico preovulatorio de LH. Esta hormona provoca cambios en las paredes del folículo, que conducen a su ruptura. Después de la ovulación, el espacio ocupado previamente por el folículo es invadido por fibroblastos, las células endoteliales, células de la teca interna y células de la granulosa (26).

2.5.6 Cuerpo Lúteo

El CL bovino experimenta un rápido crecimiento desde un tamaño de menos 5mm en la ovulación hasta 20mm en 10 días equivalente a un aumento de 60 a 100 veces en el volumen celular y la tasa de crecimiento lúteo solo se compara con los tumores de crecimiento más rápido, curiosamente en la vaca el aumento postovulatorio de la progesterona se retrasa con respecto al crecimiento del CL entre 2 y 3 días esto podría estar relacionado con las diferencias en los procesos de remodelación y vascularización del tejido luteal dependiendo todo este proceso de la angiogénesis intensa o formación de nuevos vasos sanguíneos (27).

2.5.6.1 Formación del Cuerpo Lúteo

La formación del cuerpo lúteo es un proceso biológico muy complejo con numerosos eventos que ocurren en un periodo de tiempo relativamente corto, que incluye:

1. Luteinización / diferenciación de células de la granulosa y de la teca en las células lúteas
2. Un cambio de esteroidogénesis del estradiol a la producción de progesterona que se acompaña de una regulación al alza masiva de esteroidógenos (hasta mil veces en la vaca)

Remodelación extensa, mezcla de células (particularmente en rumiantes) y proliferación del tejido folicular en un CL completamente desarrollado (27).

El cuerpo lúteo de la vaca es un órgano dinámico, el cual tiene una vida media de aproximadamente 17 a 18 días (28), cuya principal función es secreción de la progesterona; hormona que actúa básicamente sobre los órganos genitales de la hembra, siendo la responsable de la preparación del útero para recibir el embrión y para mantener la preñez.



2.5.6.2 Estructura

Está formado por una matriz extracelular (ECM), que es un sistema complejo compuesto por una red de colágenos asociados con proteoglicanos y glicoproteínas, componentes que proporcionan la arquitectura para mantener unidas a las células, además de las metaloproteinasas de matriz que escinden componentes específicos de la ECM. Esta ECM posee un efecto profundo sobre las funciones celulares y tiene una parte importante en los procesos de desarrollo folicular y atresia, ovulación y en el mantenimiento y regresión del CL (27). Además, el cuerpo lúteo maduro está compuesto de muchas células endoteliales vasculares, las cuales pueden alcanzar hasta el 50% de todas las células del cuerpo lúteo.

2.5.6.3 Función del cuerpo lúteo

La principal función del cuerpo lúteo es secretar grandes cantidades de progesterona. cuando el cuerpo lúteo madura, las células esteroideogénicas establecen contacto con muchos capilares, en el ganado bovino y en otras especies, el cuerpo lúteo juega un papel en la regulación de la ciclicidad y el mantenimiento de la preñez (28).

Bioquímicamente se observa que después del pico de LH la producción de androstenediona y 17 Beta estradiol disminuye, en contraste comienza a incrementarse la síntesis de progesterona. Así en el día 4 o 5 después de la ovulación las concentraciones de progesterona en sangre son mayores de 1ng/ml, lo que indica que el CL ha adquirido su plena funcionalidad. A partir de ese momento, y hasta el día 14 del ciclo de la oveja, 0 del día 18 en la cabra y vaca, el cuerpo lúteo secretara progesterona (26)

La estructura y función del cuerpo lúteo dependen del desarrollo de una compleja vascularización a través del proceso de angiogénesis. Esta vascularidad empieza en el folículo preovulatorio estimulado por el aumento de la hormona luteinizante (LH), que posterior a la ovulación dicho CL experimenta un crecimiento muy rápido y una extensa angiogénesis que a su vez están regulados por el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular A (VEGFA) y el Factor de Crecimiento Folicular 2 (FGF2) (27).

El cuerpo lúteo es una glándula que tiene una fase de crecimiento, otra de desarrollo y una de regresión. La regresión del tejido luteal se da por la liberación pulsátil de la



prostaglandina (PGF2a) desde el endometrio uterino. El mecanismo por el cual inicia la síntesis de PGF2a depende de la interacción entre el cuerpo lúteo, los folículos ováricos y el útero (26).

2.5.6.4 Flujo sanguíneo ovárico y el cuerpo lúteo

La concentración de oxígeno en la sangre arterial bovina no cambia significativamente durante el ciclo estral, pero tiende a estar en niveles altos durante la fase lútea funcional y luego disminuye antes de la ovulación porque la luteinización de la granulosa folicular y las células de la teca antes y después de la ovulación disminuyen el suministro de oxígeno al ovario durante este periodo, además el suministro de sangre al ovario durante varios días alrededor de la ovulación es significativamente menor, por esta razón los eventos ováricos que ocurren en este periodo como la maduración de folículos en etapa terminal, la ovulación como tal y la formación lútea, se consideran que progresan en condiciones de bajo oxígeno.

Durante el último periodo de desarrollo folicular antes de la ovulación, los niveles de oxígeno parecen participar en la función folicular mediante la regulación de múltiples fenómenos, como la esteroidogénesis y la angiogénesis, no se conoce a cabalidad los niveles de oxígeno en el tejido luteal de nueva formación inmediatamente después de la ovulación, pero las condiciones de hipoxias tienden a ser una clave en la luteinización y la formación del cuerpo lúteo

Después de la ovulación, se cree que el folículo roto está en un estado hipóxico debido al sangrado, la vasculatura inmadura y proliferación celular sin un suministro de sangre equivalente, se cree que el tejido luteal temprano justo después de la ovulación se encuentra en condiciones hipóxicas debido a la destrucción de la vasculatura mediante la ovulación como una explicación de la condición hipóxica y porque la proliferación celular intensiva en el CL temprano no se corresponde inicialmente con el número de vasos sanguíneos.

2.5.6.5 Regresión del CL

Luego de cada ciclo estral al no producirse la preñez o cuando ya no se requiere la progesterona para el mantenimiento de la preñez el CL deja de producir dicha hormona y retrocede en un proceso llamado Luteólisis, en roedores este proceso



abarca dos fases: la primera, denominada regresión funcional, hay una marcada disminución de la progesterona causada por el catabolismo a su forma biológicamente inactiva $20\alpha\text{DHOP}$ y la segunda, conocida como regresión estructural que ocurre después de la disminución inicial en la producción de progesterona, durante esta fase el CL pierde su integridad vascular y las células lúteas mueren por muerte celular programada (apoptosis) (27).

En muchas especies, la regresión lúteal se inicia por la liberación uterina de prostaglandinas $\text{F2}\infty$, la cual inhibe la esteroidogénesis desencadenando una cascada de eventos que lleva a la desaparición final del tejido. Las células inmunes principalmente los macrófagos y los linfocitos T, son importantes para la ingestión de los restos celulares que resultan de la muerte de las células luteales. Los macrófagos son células multifuncionales que juegan un papel clave en la respuesta inmune y son abundantes en todo el tejido reproductivo de la hembra. Su localización específica y las variaciones de la distribución en el ovario durante los diferentes estados del ciclo, sugieren que los macrófagos juegan diversas funciones en los eventos intraovarios, lo que incluye: la foliculogénesis, la reestructuración del tejido en la ovulación y la formación y regresión del CL (28).

2.6 Progesterona

La progesterona es principal producto secretado por el CL, esta hormona actúa sobre el tracto reproductivo de la hembra, y es el responsable de la preparación del útero para el establecimiento y mantenimiento de la gestación (26). Es una hormona esteroidea producida por el cuerpo lúteo por acción de la LH, produce el cuerpo lúteo, sus efectos se observan después de que el tejido blanco ha estado expuesto durante cierto tiempo a la estimulación de los estrógenos. A nivel hipotalámico ejerce un efecto feed back negativo sobre el control de la actividad tónica de la secreción de la GnRH (1).

Además, la progesterona estimula la secreción de sustancias que nutren al embrión hasta que aparezca la placenta y sustituya o refuerce esta función (29). También inhibe las contracciones uterinas, cierra el cérvix y modifica las características del moco cervical, volviéndose más viscoso para evitar la entrada de agentes extraños al



interior, por otra parte la progesterona estimula el desarrollo del sistema alveolar de la glándula mamaria preparándola para la síntesis y secreción de leche (26).

Es importante mencionar que la concentración de progesterona en el plasma, refleja directamente la función del cuerpo lúteo y constituye un preciso indicador de la función ovárica en la vaca. La progesterona domina la mayor parte del ciclo estral de la vaca, siendo evidentes cantidades detectables tres a cuatro días después de la formación del cuerpo lúteo; la producción diaria de progesterona se eleva mucho durante varios días hasta alcanzar una meseta de secreción, el día ocho del ciclo (30).

2.7 Biotecnologías reproductivas

La biotecnología reproductiva en bovinos comprende diferentes técnicas que van desde la inseminación artificial (IA) hasta la clonación, esta última tiene estrecha relación con las técnicas génicas ya que motivan el avance científico moderno, mediante la inyección de ADN en los pronúcleos de inmensas cantidades de cigotos bovinos u ovinos para producir un embrión *in vitro* (1).

2.7.1 Producción *in vitro* de embriones

En 1981 nació el primer ternero producto de la FIV, en ese entonces el medio de cultivo *in vitro* usado permitió desarrollar al cigoto hasta una determinada etapa, entonces se usó medio de cultivo *in vivo* cultivados en oviductos de oveja, pero esta técnica compleja dio una pérdida hasta un tercio de embriones transferidos, actualmente con el empleo de (cultivos celulares) co - cultivos de células somáticas es posible brindar un medio *in vitro* adecuado para el desarrollo normal de los embriones. La producción *in vitro* de embriones comprende tres fases:

- Maduración *in vitro* de ovocitos mediante la punción folicular de ovarios recolectados.
- Fecundación *in vitro* de los ovocitos madurados
- Cultivo *in vitro* de embriones (31).



2.7.2 Conservación de embriones

Se encuentra asociada a la Transferencia de embriones (TE), a través de diferentes métodos como en baños de alcohol y otros que están experimentándose actualmente como lo es la vitrificación. La ventaja de esta biotecnología es que, células en estado de mórula o blastocistos que se obtienen por TE pueden ser congelados, descongelados y transferidos con una tasa de pérdida en la gestación de (50% – 60%), y además al transportar un animal internacionalmente nos costaría \$1000 o más, en cambio por el mismo precio o menos se puede transportar de 500 – 4000 embriones congelados (1).

Constituyen una biotécnica que posibilita, mediante la utilización de bajas temperaturas (-196°C N₂), almacenar embriones de una amplia variedad de especies sin que pierdan su capacidad de desarrollar y nacer vivos.

Actualmente los métodos más utilizados para criopreservar embriones son la congelación convencional y la vitrificación.

De las cuales se ha obtenido las siguientes ventajas:

- Independizar en tiempo y espacio la producción de embriones
- Almacenamiento de germoplasma por tiempo indeterminado
- Comercialización de embriones.
- Aumentar el progreso genético (32).

La criopreservación posibilita almacenar de una amplia variedad de especies mamíferas sin que pierda su capacidad de desarrollar y nacer vivos. Si bien los embriones son un conjunto de las células, se aplican principios criobiológicos originalmente estudiados en culas aisladas tales como linfocitos y fibroblastos.

La revelación de la vitrificación para criopreservación de material biológico fue sugerida inicialmente por Luyet en 1937 quien aseveró que la cristalización es incompatible con los sistemas vivos y debe ser evitada siempre que sea posible. Asimismo, reseñó que era posible la criopreservación de sistemas vivos pequeños a



velocidad muy altas de congelación, logrando eliminar la formación de hielo y crear en su lugar un estado vítreo o similar al vidrio.(33)

2.7.3 Criopreservación de embriones

2.7.3.1 Principios básicos de la criopreservación.

Las soluciones acuosas mantienen su estado líquido hasta el momento que la temperatura baje a 0°C que es el punto de fusión del hielo. Este estado se mantiene hasta tal punto que habrá una reorganización molecular que va a provocar la solidificación de todo el sistema (cambio de estado líquido a sólido), en este momento las moléculas de agua alcanzan un nivel mínimo de energía, fenómeno que no se produce de forma instantánea y que depende mucho de la velocidad de enfriamiento, si la velocidad de enfriamiento es muy elevada, la reorganización molecular que aparece en un punto del sistema toma forma de una red cristalina. De esta manera el agua líquida toma forma de hielo cristalino formado por cristales hexagonales (34)

Por el contrario si la velocidad de enfriamiento es muy alta las moléculas de agua se tornan inmóviles y permanecen fijadas sin reorganización aparente. A este fenómeno se conoce como vitrificación, es decir la formación de un estado sólido, amorfo, sin una red cristalina aparente. En este estado la viscosidad del medio es tan elevada que las moléculas no pueden sino oscilar sobre si mismas (35).

El daño celular de aquellas células que son sometidas a temperaturas bajo cero es debido a dos factores fisicoquímicos: la concentración de solutos que acompaña la formación del hielo (efecto osmótico) y la aparición de los cristales de hielo en el interior celular (cristalización intracelular). La incidencia de la lesión en estos casos depende de diversos parámetros, especialmente de la permeabilidad de la membrana celular, que determina notablemente la probabilidad de nucleación intracelular, pero también de la relación superficial/volumen celular. (36)

La vitrificación reduce los daños producidos por el frío utilizado a altas concentraciones de (CPA's) y elevadas velocidades de enfriamiento y calentamiento, evitando la formación de cristales de hielo. Durante la vitrificación, y tras un enfriamiento ultrarrápido, aumenta la viscosidad del medio que contiene al embrión /ovocito,

alcanzando un estado sólido sin cristalización (estado vítreo). En estas soluciones muy concentradas de crioprotectores ($>6M$), las células sufren una deshidratación osmótica previa al enfriamiento (35).

2.7.3.2 Envasado de los embriones

Actualmente el elemento más utilizado para contener los embriones tanto para la criopreservación como para su transporte o transferencia. Lo constituye la pajuela de plástico de 0.25ml de capacidad. Diversos modos de cargar las pajuelas, pero en la mayoría, el o los embriones se encuentran contenidos en una columna de 0.5 a 2 centímetros de solución de congelación separado de las otras columnas, ya sean de PBS con suero o soluciones de sacarosa como en el método de One- Step separados por burbuja de aire. En general, las pajuelas una vez congeladas son selladas en su extremo abierto con alcohol polivinílico.

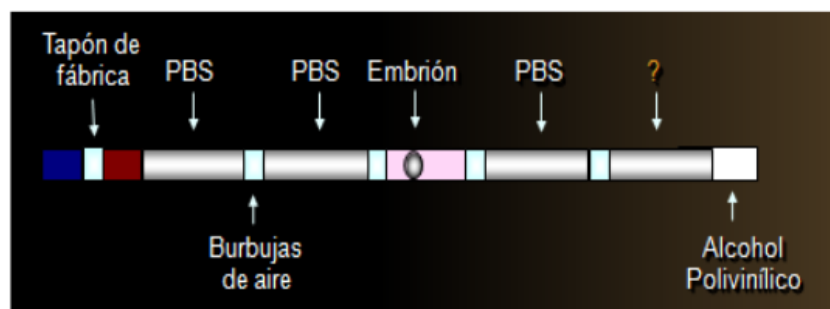


Figura 3. Envasado de los embriones para la congelación.

Fuente: (32)

2.8 Técnicas de Criopreservación.

El primer protocolo que se utilizó para la criopreservación de células mamíferas se restableció hace 60 años y desde entonces se ha buscado mejoría hasta la actualidad. Se han realizado varios estudios comparando diversos métodos de criopreservación, los cuales se han clasificado de acuerdo a la velocidad de enfriamiento y calentamiento, entre estas tenemos: congelación lenta convencional y congelación lenta descongelación rápida, congelación ultrarrápida y la vitrificación el cual da grandes éxitos hasta la actualidad (36).



La mayoría de los métodos tradicionales de vitrificación utilizan la pajuela plástica francesa para la congelación, almacenamiento y descongelación de los embriones. Cuando los embriones son congelados en forma tradicional, en pajuelas plásticas, la formación de cristales de hielo se previene por el uso de altas concentraciones de crioprotectores y altas tasas de congelación y descongelación (37).

Desde el inicio de la vitrificación de embriones mamíferos, se ha podido evidenciar una creciente variedad de técnicas, que han surgido en la búsqueda de mejor supervivencia embrionaria, a través de una reducción considerable del volumen de solución de vitrificación y aumentando las tasas de enfriamiento (38).

La técnica de criopreservación utilizada predominantemente para los embriones IVP es la vitrificación debido a su simplicidad, velocidad y bajo costo. Sin embargo, esta técnica utiliza altas concentraciones de crioprotectores, requiere un laboratorio y personas capacitadas para evaluar los embriones antes de la transferencia, lo que restringe el uso de esta técnica a gran escala. Por otro lado, la congelación lenta de la transferencia. Además, se puede usar concentraciones más bajas de crioprotectores, lo que reduce la toxicidad para los embriones (39).

2.8.1 Congelación lenta

En los procedimientos de congelación lenta, el enfriamiento se realiza a una velocidad suficientemente lenta que permite a las células responder osmóticamente a través de la deshidratación. En otras palabras, debe mantenerse el equilibrio tras el intercambio a través de la membrana, pasando por la máxima deshidratación celular viable. En estos protocolos se reduce la temperatura de manera gradual pasando por un intervalo crítico en el que se aplican velocidades extremadamente lentas ($-0,3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) hasta alrededor de -50°C . a partir de este punto se incrementa un poco la velocidad de enfriamiento, hasta alcanzar los -150°C , y se sumerge las muestras directamente en NL (40).

La congelación es la técnica de elección para la criopreservación de embriones bovinos producidos in vivo. En este tipo de embriones, la congelación convencional ha permitido obtener resultados ligeramente inferiores a los registrados con embriones



en fresco. Al mismo tiempo la introducción del etilenglicol como crioprotectores permitió desarrollar la técnica de transferencia directa de embriones congelados-descongelados, posibilitando la aplicación de esta técnica en condiciones de campo, sin necesidad de remover el o las crioprotectores utilizadas. Durante el procedimiento de congelación, las células embrionarias sufren cambios importantes asociados a la formación de hielo intra o extracelular que puedan disminuir la sobrevida poscriopreservación. Para poder minimizar estos problemas se han recurrido al uso de sustancias crio protectoras, así como a tasas de descenso térmico controladas mediante la utilización de máquinas congeladoras programables. (32).

2.8.2 Vitrificación de embriones

La vitrificación es un método de crio preservación extremadamente rápida, en el cual los embriones son incluidos en soluciones altamente concentradas de crio protectores y sumergidos directamente en el nitrógeno líquido, desde una temperatura superior a los 0°C, demorándose así solo unos segundos en congelarse. De esta manera se logra la solidificación de la solución crio protectora al tomar contacto con el nitrógeno líquido, producto del aumento extremo de su viscosidad (37).

La crio preservación de gametos y embriones ha desempeñado un papel fundamental en el éxito de las tecnologías de reproducción asistida en roedores, especies de granja domésticas, especies en peligro de extinción y seres humanos. Con el éxito mejorado y las necesidades cambiantes, la utilidad de la crioconservación de gametos o embriones ha aumentado (41)

El avance en la criobiología, la biología celular y la embriología de animales domésticos han hecho capaz el desarrollo de metodologías de preservación de embriones de varias especies domésticas. La criopreservación, junto a la transferencia de embriones e inseminación artificial, es una de las técnicas que puede contribuir al incremento de la productividad animal, ya que permite la preservación y transporte de germoplasma y, por lo tanto, se incrementa la posibilidad de incrementar el número de crías por hembra a lo largo de su vida reproductiva.(42)

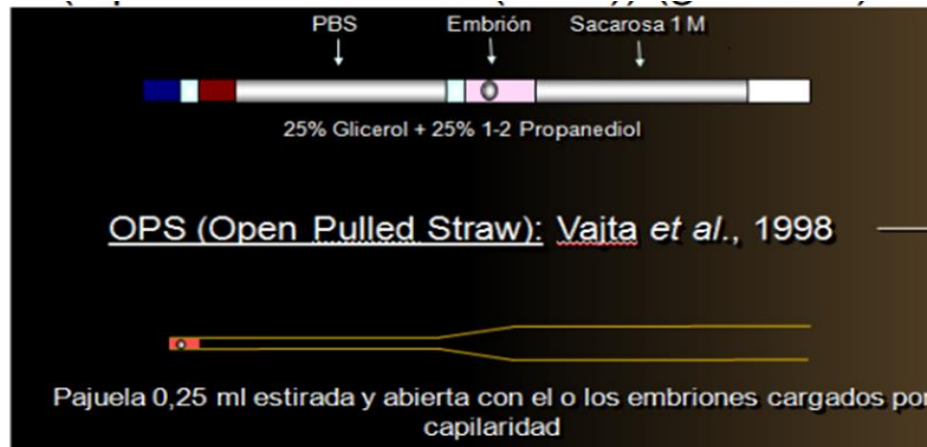


Figura 4. Envasado de los embriones para la vitrificación.

Fuente: (32)

La deshidratación determina cambios en el volumen osmótico de los embriones durante el proceso de criopreservación, sin que se formen cristales de hielo durante el enfriamiento, almacenamiento o calentamiento. La mayor velocidad de los cambios de temperatura ofrece dos ventajas: permite reducir el tiempo de contacto entre el embrión y los CPA's, disminuyendo así los efectos tóxicos y osmóticos, y limitando el riesgo de lesiones por la exposición a bajas temperaturas debido a la rápida transición por la zona de "temperatura crítica" frente a la que los embriones presentan una elevada fragilidad (35)

2.9 Vitrificación frente a la congelación

El congelamiento convencional tiene una ventaja comparativa frente a los métodos de criopreservación, al ser una metodología que permite la utilización de bajas concentraciones de crioprotectores y permite la transferencia directa de los embriones después de la descongelación, sin embargo su habilidad para prevenir la formación de hielo intracelular aun es limitada, además, los resultados *in vitro* de la criopreservación de embriones han sido variables y menores en comparación a los datos obtenidos en embriones *in vivo*. (33)

La razón por la cual existe esta variación en la viabilidad de los embriones producidos *in vitro*, en comparación con los producidos *in vivo*, es probablemente por las



características físicas propias del primer tipo de embriones, que hacen que sean más sensibles a bajas temperaturas.

Entre dichas características, se encuentran diferencias no solo morfológicas sino también físicas como:

1. El aumento en el número de vacuolas.
2. Mayor fragilidad de la zona pelúcida
3. Menor competencia embrionaria
4. Un menor número de blastómeros, sobre todo en la masa celular interna.
5. Alteraciones en la expresión genética
6. Mayor tasa de apoptosis
7. Aumento en el alto contenido citoplasmático de lípidos. (33)

No hay ninguna razón para creer que la duración habitual de la crioconservación de pequeñas cantidades de embriones en nitrógeno líquido debe ser un factor que afecta a su viabilidad después de la descongelación. (38)

La tasa de embarazo utilizando embriones producidos *in vitro* (IVP) han sido generalmente más bajas que las informadas para los embriones derivados *in vivo*, que pueden estar relacionados a nivel morfológico, ultraestructural, metabólica, bioquímica y genoma entre las dos categorías de embriones. Existen indicaciones claras de que la sensibilidad al enfriamiento de embriones de ganado depende de su etapa de desarrollo y de las condiciones de cultivo, así como de la presencia de numerosas gotitas de lípidos en el citoplasma en los embriones de PIV (38).

La vitrificación es la solidificación de una solución a bajas temperaturas sin la formación de cristales de hielo. La vitrificación se puede ver como un aumento de la viscosidad y requiere velocidades de enfriamiento rápidas. La clave del éxito de la vitrificación radica en los procedimientos que minimizan la formación de cristales de hielo intracelular y la lesión por enfriamiento de la membrana. (43).

La vitrificación de ovocitos y el embrión producido *in vitro* tiene prácticas limitadas para la producción asistida en bovinos. Sin embargo, esta tecnología es esencial tanto por razones biológicas como comerciales. Las obtenciones de embriones bovinos viables



a partir de ovocitos vitrificados han resultado difíciles, y las tasas de supervivencia y desarrollo dispares después del calentamiento, al igual que las diferencias en cuanto a la falta de igualdad, significa que todavía no existe.

2.10 Evaluación de embriones después de la descongelación

Los embriones *in vitro* de ganado bovino se caracterizan por una mayor sensibilidad de enfriamiento y una capacidad muy reducida para tolerar la congelación en comparación con sus contrapartes producidas *in vivo*; después de la crioconservación, la tasa de reexpansión y eclosión *in vitro* es alta, pero el desarrollo después de la transferencia sigue siendo baja. Se cree que la falla de viabilidad después de la descongelación y la transferencia probablemente se debe a un daño celular o alteraciones metabólicas durante el proceso de crioconservación (44).

El número de células, así como su grado de diferenciación están altamente relacionadas con la calidad embrionaria y por ello son objeto de estudio mediante técnicas de tinción. En el blastocisto se diferencia dos tipos de celulares: la masa celular interna constituida por el grupo de culas pluripotentes que se sitúa en el polo embrionaria del blastocisto y le da lugar al embrión, y el trofotodermo, formado por células diferenciadas que ocupan la periferia del blastocisto y que darán lugar a la formación de la placenta y anejos fetales.

La tinción vital permite determinar el número de células vivas del embrión, mientras que la tinción diferencial permite un recuento de las células de la masa celular interna y del trofotodermo ambas proporcionan información sobre la calidad del embrión (45).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Recursos materiales disponibles

- Computadora y programas informáticos sitios de navegación.
- Libros acordes a la temática.
- Impresora.
- Overol.



- Botas
- Casco
- Mandil.

3.1.2 Recursos materiales requeridos

- **Materiales Físicos**

- Recipientes para recolección de orina.
- Guantes (Látex)
- Papel aluminio, papel de ordeño
- Placas Petri redondas de 35 mm.
- Agujas de 20 G, jeringas de 2 piezas sin caucho y capilares Drummond.
- Horas de bisturí.
- Cajas Petri de cultivo.
- Cámara fotográfica.

- **Biológicos**

- Ovarios bovinos.
- Personal.

- **Químicos.**

- Solución salina (cloruro de sodio).
- Aceite mineral
- Alcohol 70%
- Hialuronidasa
- Medio de recolección (PBS +heparina sódica + suero fetal bovino)
- Azul de Tripán.
- Desinfectantes (jabón)

- **Materiales de Laboratorio**

- Estéreo microscopio.
- Vaso de precipitación, baño María, platina de calefacción
- Balanza, cajas de cultivo NUNC con pocillos (4 o 5)
- Puntas de pipeta (tips) amarillos sin corona y tubos Ependorf de 3 ml

- **Materiales de oficina**

- Cuaderno de campo y esferos



- Tablero de campo
- Medios extraíbles (Flash Memory USB).
- Calculadora y marcadores.

3.1.3 Área de estudio

El presente estudio se realizó en el laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Granja de Irquis, de la Universidad de Cuenca, ubicada en la parroquia Victoria del Portete (Figura 1), a 22 Km de la ciudad de Cuenca. La granja mencionada se encuentra a una altitud de 2796 msnm. La precipitación anual oscila entre 1000 y 2500 mm, con temperatura que varían entre 3 a 11°C.



Figura 5. Ubicación de la granja de Irquis

Fuente: Climate – Data.Org, (2016)

3.2 Métodos

3.3 Unidad experimental

En este estudio se utilizaron 348 ovarios de matadero (116 por cada grupo experimental) de los cuales se obtuvieron 2532 ovocitos recuperados por aspiración folicular en 13 repeticiones.

Los ovocitos seleccionados en este experimento fueron recuperados de ovarios de tres categorías: 1, de un par de ovarios (ipsilateral) con presencia de un cuerpo lúteo



(CL) que, según sus rasgos exteriores, se consideró que está entre los días 5 y 17 del ciclo estral tal como lo describe (15); 2, del ovario opuesto (contralateral) al anterior, que carecía de estructura luteal; 3, por cada par previamente descrito, se colectó un ovario de vacas en que ninguno de los ovarios había un cuerpo lúteo.

3.4 Diseño experimental

Se conformaron 3 grupos experimentales con dos tratamientos y un testigo:

Grupo 1: Ovario Ipsilateral: con cuerpo lúteo (CCL)

Grupo 2: Ovario Contralateral: sin cuerpo lúteo (SCL)

Grupo 3: Testigo o control: sin cuerpo lúteo en ambos ovarios (C).

3.4.1 Análisis estadístico

Se aplicó un modelo completamente aleatorizado. Las proporciones, expresadas como porcentajes, se analizaron mediante la regresión logística del SAS (Statistical Analysis Systems, 2012), mientras que el número de blastómeras sanas y alteradas se analizaron mediante el análisis de varianza usando el procedimiento GLM del programa estadístico SAS. Las diferencias entre medias se compararon con el procedimiento LSMeans del SAS. Los valores con $P < 0,05$ fueron considerados significantes y $P < 0,10$ tendencia estadística.

3.5 Variables en estudio

Independientes:

- Presencia o no de un CL en el ovario del cual se obtuvo los ovocitos
- El día de recuperación de los mismos (repeticiones o colectas de ovarios; $n=13$)
- Presencia o no de un folículo dominante (mayor a 8 mm) del ovario del cual se obtuvieron los ovocitos



Dependientes

- Proporción de ovocitos fecundados (tasa de clivaje)
- Proporción de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto.
- Proporción de embriones que re-expandieron.
- Proporción de embriones que protruyeron (se liberaron de la zona pelúcida).
- Número y porcentaje de blastómeras alteradas y número de blastómeras sanas.

3.6 Metodología

3.6.1 Recolección de ovarios de matadero

Los ovarios fueron recolectados del Camal Municipal de Cuenca (EMURPLAG EP) una o dos veces por semana hasta completar 13 repeticiones. Inmediatamente extraídos del animal, los ovarios fueron colocados en recipientes de plásticos con tapa (recolectores de orina) con solución salina atemperada entre 35 y 38°C en su interior. Luego transportados hasta el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal en un tiempo no mayor a tres (3) horas.

Una vez en el laboratorio se lavaron los ovarios con solución fisiológica (cloruro de sodio al 0,9%) estéril dos o tres veces hasta que el contenido líquido se vea completamente cristalino, y los tejidos adyacentes a los ovarios (cuernos uterinos, ligamento, segmentos de oviducto, etc.) se removieron cuidadosamente con una tijera, sin dañar los folículos de la superficie ovárica.

Luego de esto se procedió a pesar cada uno de los ovarios con cuerpo lúteo y se tomó nota del peso respectivo antes y después de haber puncionado los folículos para la recuperación de ovocitos. El mismo procedimiento se realizó con los ovarios que no tenían cuerpo lúteo, es decir, con los SCL y C.

Luego de aspirar, clasificar y procesar los ovocitos según lo indicado en este apartado, los cuerpos lúteos se separaron del resto del tejido ovárico, se fotografiaron, pesaron y registraron de acuerdo al ovario del cual fueron disecados.

3.6.2 Aspiración de los ovocitos

Se aspiraron los folículos antrales de cada ovario con un diámetro entre 2 a 8 mm. La punción y aspiración de folículos se realizó empleando una jeringa desechable de dos piezas (con embolo sin caucho) acoplada a una aguja de calibre 20 G (Figura 1). El líquido folicular de cada ovario fue depositado en un tubo Eppendorf de 2 ml, el cual se identificó de acuerdo al grupo experimental que corresponde.



Figura 6. Punción y aspiración folicular.

Fuente: Autora; Shirley Merchán, (2018)

Una vez aspirados los folículos de todos los ovarios, se dejó reposar por un lapso de 15 min, los ovocitos acumulados en el fondo de los tubos Eppendorf fueron succionados con una pipeta Pasteur y colocados en una placa de búsqueda de 95 mm de lado con fondo cuadrículado, para facilitar la exploración e identificación de las estructuras.

3.6.3 Evaluación de la calidad de los complejos cúmulos ovocitos

Inmediatamente después, la placa se llevó a un microscopio estereoscopio donde se realizó la búsqueda y selección de los complejos cúmulos ovocitos (COC's), que una vez identificados como aptos (A, B)(47) para la maduración, fueron trasferidos a través de 4 o 5 gotas de 200 μ L de medio HSOE, con la finalidad de lavarlos y librarlos de detritos tisulares. Se registró el número de ovocitos encontrados por ovario. Los

COC's obtenidos fueron evaluados y calificados de acuerdo a (6) como se describe a continuación:

Categoría (1) A, buena calidad, con varias capas (tres o más) de células del cumulo rodeando en forma compacta a la zona pelúcida, cuyo citoplasma esta finamente granulado y homogéneo.

Categoría (2) B, calidad regular, con menor número de capas del cúmulo ligeramente adheridas (tres o menos), rodeando a la zona pelúcida, y con granulaciones citoplasmáticas ligeramente más gruesas y/o menos homogéneas.

Categoría (3) C, mala calidad, parcial o completamente desnudos (sin células del cumulo alrededor de la zona pelúcida) y con cúmulos disperso y descolorido, (café claro o muy oscuro), y citoplasma con granulaciones heterogéneas y áreas claras y oscuras.

Categoría (4) D, mala calidad, presencia de cúmulo expandido, citoplasma muy oscuro, y signos de maduración y/o degeneración ovocitaria.

Una vez clasificados los COC's se cuantificaron según los aspectos antes descritos, y se utilizaron únicamente los aptos de categoría A y B, los cuales se pusieron a madurar en gotas de 100 μ L de medio de maduración, con la finalidad de que completaran la meiosis.

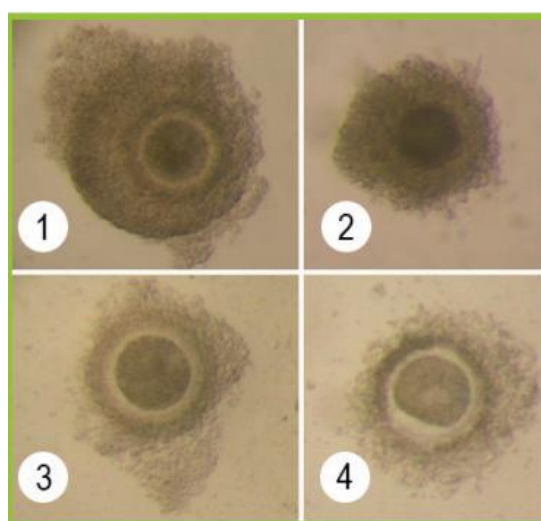


Figura 7. Clasificación por la calidad de COCs.

Fuente: López Cardona, Gómez Morales, Morales Tarazona, & Olivera, (2014)

3.6.4 Maduración in vitro de los complejos cumulo ovocitos

Se utilizó un medio maduración preparado a base de TCM 199, suplementado con 10% suero fetal bovino, 100 µg/ml de Piruvato de Sodio, 0,75 mg/ml de L-Glutamina, 4 µg/ml de FSH-p (Folltropin®, Bioniche, Canadá), 2 µg/ml de Estradiol y 250 µg/ml de Gentamicina. Cada grupo de COCs se colocó en microgotas de 100 µl en placas de Petri de 5 cm, en una estufa con CO₂ a 5%, humedad a 90% y a 38.5 °C por un período de 18 a 24 horas para su maduración (Figura 8).



Figura 8. Maduración de COCs, en el laboratorio.

Fuente: Autor; Milton Tenemaza, (2018)

3.6.5 Fecundación in vitro y determinación de la tasa de clivaje

Luego de la maduración, los COCs se lavaron en gotas de medio H-SOF (Hepes-Fluido Oviductal Sintético) y colocaron en microgotas de medio de fecundación (FIV-SOF) suplementado con 10 µg/mL de heparina, en una incubadora con 5% de CO₂, 90% de humedad y a 38.5 °C por un período de 24 horas.

Previo a iniciarse el período de incubación antes descrito, las microgotas individuales de FIV-SOF conteniendo los COCs de cada tipo de ovario, se inseminaron con semen descongelado, previamente procesado mediante su pasaje a través de columnas de Percoll (Figura 9), con la finalidad de usar los espermatozoides mejor capacitados para la fecundación.

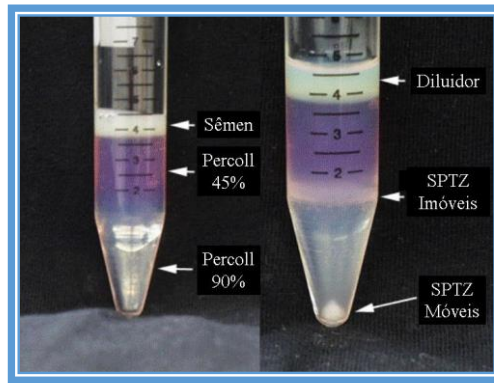


Figura 9. Pasaje de semen a través de las columnas de Percoll.

Fuente: Fernando Perea, (2018)

Terminado el procedimiento anterior, se estimó la concentración de espermatozoides y se determinó el volumen de semen para colocar un equivalente a 1-1,5 millones de espermios por mililitro.

Luego de culminado el periodo de fecundación, las células del cúmulo se separaron mecánicamente de los ovocitos no fecundados y de los presuntos embriones, y 24 horas más tarde se determinó la proporción de clivaje.

3.6.6 Cultivo in vitro y desarrollo de blastocistos

Los embriones producidos en la etapa anterior, provenientes de cada tipo de ovario, fueron transferidos a microgotas de medio de cultivo (Cit-SOF), e incubados bajo una capa de aceite mineral, en un ambiente saturado de humedad a 38.5 °C, 5% de CO₂ y 90% de nitrógeno y por 7 días. Al finalizar este periodo, se determinó el número de blastocistos y de las diferentes categorías de embriones obtenidos por cada grupo experimental.

3.6.7 Criopreservación de embriones

En el día 7, los embriones que alcanzaron el estado de blastocistos fueron criopreservados mediante dos métodos: vitrificación y congelación lenta.



Figura 10. Estadios de desarrollo embrionarios en bovinos, transferibles al día 7.

Fuente: López Cardona *et al.*, (2014)

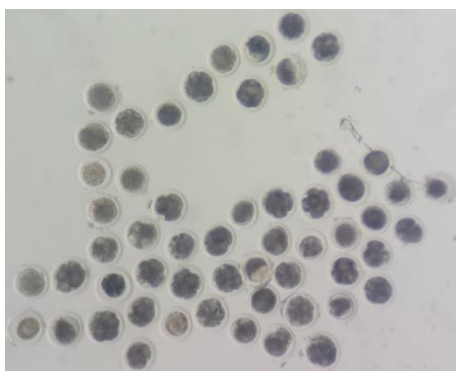


Figura 11. Estadios de embriones encontrados.

Fuente: Autor; Milton Tenemaza, (2018)

3.6.8 Soluciones y procedimiento para la vitrificación de embriones

Para este procedimiento se prepararon las 4 soluciones que se describen a continuación: (1) **mantenimiento** (SM), constituida por H-SOF (80%) y suero fetal bovino (20%); (2) **de sucrosa** (SS) 0,5 molar, que se preparó diluyendo 1,71 g de sucrosa en 10 ml de SM; (3) **de vitrificación 1** (SV1), elaborada con 850 μ L de SM + 75 μ L de etilenglicol (EG) + 75 μ L de dimetil sulfóxido (DMSO); (4) **de vitrificación 2** (SV2), que se preparó con 670 μ L de SS + 165 μ L de EG + 165 μ L de DMSO.

El procedimiento de vitrificación, implicó que los blastocistos fueron expuestos, en microgotas de 100 μ L, a tres soluciones en forma secuencial, cumpliendo los siguientes tiempos: SM 5 minutos, SV1 3 minutos y SV2 \leq 30 segundos.

Una vez finalizado el tiempo de exposición de los blastocitos a la SV2, los embriones fueron colocados (por capilaridad) en el extremo de un catéter (Tom Cat; Figura 12)

de plástico y vertidos en un recipiente con nitrógeno líquido y almacenado en un termo hasta el momento de revertir el proceso (desvitrificación).

3.6.9 Soluciones y procedimiento para calentar los embriones

El procedimiento opuesto a la vitrificación se denomina calentamiento. En este proceso se utilizaron dos soluciones: (1) **de calentamiento 1** (SC1) 0.25 M, elaborada agregando 500 μL de SM y 500 μL de SS; y (2) **de calentamiento 2** (SC2) 0.15 M, la cual se preparó con 850 μL de SM + 150 μL de SS.

Los embriones vitrificados se colocaron en la SV1 por 1 minuto y en la SV2 por 5 minutos, ambas soluciones a 37°C. Inmediatamente después se transfirieron a microgotas con medio de cultivo (Cit-SOF), bajo una capa de aceite mineral, en una incubadora con un ambiente saturado de humedad a 38.5 °C, 5% de CO₂ y 90% de nitrógeno, por 48 horas.



Figura 12. Catéter Tom Cat usado para vitrificar embriones

3.6.10 Congelación lenta de embriones

Las fases del proceso de congelación fueron: a) adición del agente crioprotector, b) enfriamiento del embrión, inducción de la formación de hielo (seeding), congelación y almacenamiento en nitrógeno líquido (NL), c) calentamiento, y d) retirada del crioprotector.

En este caso, los embriones fueron colocados en medio de congelación elaborada con etilenglicol (EG) a 35 °C por 10 minutos. Durante ese periodo los embriones se colocaron en pajuelas de inseminación de 0,25 mililitros en una columna central de solución de EG 1,5 M, con cuatro columnas, 2 en ambos extremos de la pajilla, de una

solución de EG 0,75 M diluida en DPBS (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco) separadas cada una por una columna de aire (Figura 13).

Las pajillas con los embriones se colocaron por 10 minutos en una cámara de congelación (Cryologic CL 3300; Victoria, Australia) previamente estabilizadas a -6°C . A partir de ese momento se inició el proceso de congelación a una tasa de $0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ por 45 minutos hasta alcanzar los -32°C , cuando fueron sumergidas en nitrógeno líquido.

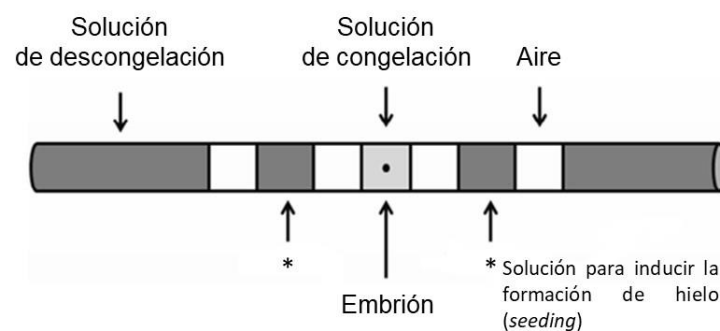


Figura 13. Esquema para la congelación de embriones en pajillas de inseminación

Fuente: Peláez, (2011)

Para la descongelación de los embriones, las pajillas se retiraron del nitrógeno líquido, se expusieron a temperatura del ambiente por 10 segundos y se sumergieron en agua a 35°C por 20 segundos. Inmediatamente después se transfirieron a microgotas con medio de cultivo (Cit-SOF), bajo una capa de aceite mineral, en una incubadora con un ambiente saturado de humedad a 38.5°C , 5% de CO_2 y 90% de nitrógeno y por 48 horas.

3.6.11 Evaluación de la sobrevida embrionaria

Luego de ser calentados o descongelados al menos 7 días posteriores a la vitrificación o congelación, los embriones de cada grupo de ovarios se colocaron en gotas de $100\ \mu\text{L}$, cubiertas con aceite mineral, de medio Cit-SOF por 48 horas. La re-expansión se valoró a las 2, 24 y 48 h mientras que la eclosión embrionaria a las 24 y 48 h.



3.6.12 Doble tinción con fluorocromos para determinar células totales y alteradas

Para este procedimiento se prepararon las siguientes soluciones: en el primero con **Ioduro de Propidio** elaborada agregando (IP Stock) 1mg de IP en 1ml de H-SOF y (IP final) 30µl de IP Stock en 970µl de H-SOF y en la segunda tinción de **Hoechst** (3342, Sigma) agregando, (Hoechst Stock) 1mg en 1ml de H-SOF y (Hoechst final) 10µl de HS en 990µl de H-SOF, también se pasaron en una **Solución de Fijación** elaborada con 750 µl de H-SOF + 250 µl de glutaraldehído y una **Solución de Montaje** elaborada con 250 µl H-SOF + 250 µl de glicerol al 2%.

Tras la sobrevida embrionaria a las 48 horas, fueron sometidos a la doble tinción con fluorocromos, en este procedimiento los blastocistos se pasaron del medio de cultivo a cajas de Petri cuadrículadas y fueron expuestas de forma secuencial a las soluciones en los siguientes tiempos: 1) en 500µl de solución de fijación durante 20 minutos a temperatura ambiente, 2) en 500µl de H-SOF por 5 minutos a T° ambiente, 3) en 500µl Ioduro de Propidio por 5 minutos a 37°C, 4) en 500µl de H-SOF por 5 minutos a T° ambiente, 5) en 500µl de H-SOF por 5 minutos a T° ambiente, 6) en 500µl con tinción de Hoechst durante 30 minutos a T° ambiente, 7) en 500µl de H-SOF por 5 minutos a T° ambiente, 8) en 500µl de H-SOF durante 5 minutos a T° ambiente.

Posteriormente al ser expuestos a la última solución fueron transferidos al portaobjeto graficado previamente pequeños círculos en el cual cabían 10 embriones por portaobjetos, luego fueron cubiertos con un cubreobjetos cada uno de los tratamientos para ser sellados y finalmente para ser llevados a observar en un microscopio invertido con un sistema luz de fluorescencia para el conteo de las células totales y células alteradas de cada embrión.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

En este estudio se utilizaron 348 ovarios (116 por cada grupo) que de acuerdo al grupo experimental tuvieron pesos diferentes. En el grupo CCL el peso promedio del ovario fue significativamente superior ($10,4 \pm 0,25$ gr; $P < 0,01$) al del SCL ($5,7 \pm 0,25$ gr) y control ($6,1 \pm 0,25$ gr), los cuales no variaron entre sí. El peso promedio del cuerpo lúteo en CCL fue de ($4,2 \pm 0,15$ gr).

4.1.1 Calidad de ovocitos

De los 348 ovarios de este estudio se obtuvieron 2532 ovocitos en 13 repeticiones, que, de acuerdo a la calidad, el 63,8% correspondieron a las categorías A y B y el 36,2% a las C y D. La Figura 14 indica que la proporción de ovocitos A + B (aptos) fue mayor (66,6 %) en CCL que en SCL (61,9 %) y C (62,7%) ($P < 0,05$); asimismo, en los C + D (no aptos), esta proporción fue menor en el grupo CCL (33,4 %) que en SCL (38,1%) y C (37,2%) ($P < 0,05$).

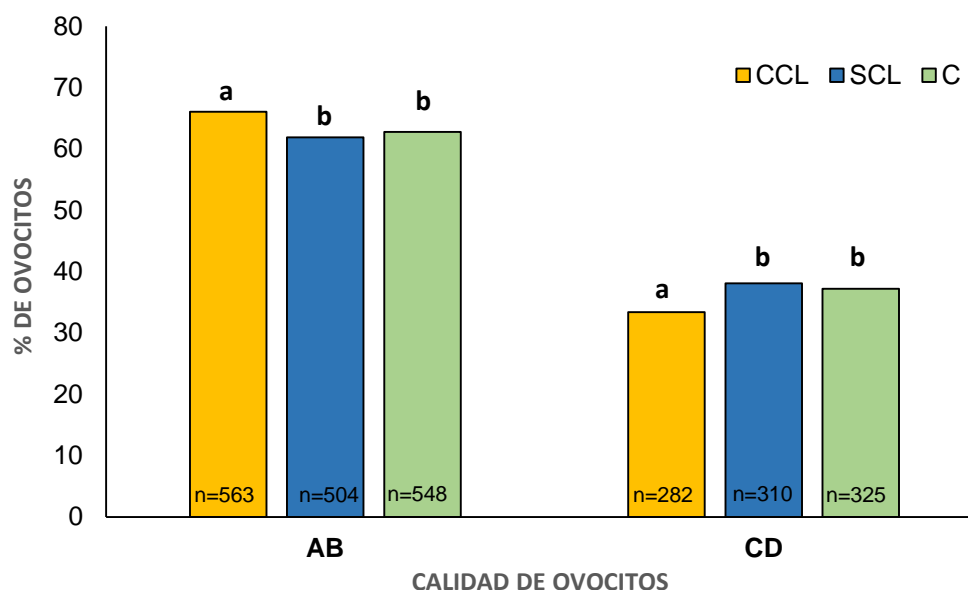


Figura 14. Proporción de ovocitos de calidades AB y CD de acuerdo a la presencia (CCL) o no (SCL, C) de un cuerpo lúteo en el ovario al momento de la colecta (^{a, b} P<0.05).

4.1.2 Tasa de clivaje y producción de embriones

Durante el estudio se maduraron 1372 ovocitos aptos, de los cuales 506 correspondieron al grupo CCL, 422 a SCL y 444 a C (Tabla 2). Luego de la fecundación *in vitro*, una mayor proporción de ovocitos del grupo CCL clivaron en comparación a los SCL y C (68,3% versus 43,8% y 46,6% respectivamente; P<0,01). Asimismo, se obtuvo una mayor proporción de embriones totales (39,0% versus 29,2% y 29,8% respectivamente; P<0,05) y de blastocistos en el día 7 (68,2% versus 39,8% y 38,7% respectivamente; P<0,01) en el grupo CCL que en SCL y C (Tabla 2). Asimismo, se obtuvieron casi el doble de embriones por ovocito puestos a madurar ($0,27 \pm 0,02$; $0,14 \pm 0,03$ y $0,15 \pm 0,03$ para CCL, SCL y C respectivamente; $P \leq 0,01$) y entre 2 y 2,6 veces más embriones por ovario utilizado ($1,13 \pm 0,1$; $0,43 \pm 0,14$ y $0,55 \pm 0,14$ para CCL, SCL y C respectivamente; P<0.01) en el grupo CCL que en SCL y C.

Tabla 2. Número de ovocitos, tasas de clivaje, de embriones en el día 7 y de blastocistos criopreservados de acuerdo a la presencia (CCL) o no (SCL, C) de un cuerpo lúteo en el ovario al momento de la colecta de ovocitos.

Tipo de Ovario	Nro. de ovocitos	Clivaje (n) %	Embriones * en el día 7 (n) %	Blastocistos ** criopreservados (n) %

CCL	506	(323)	63.8 ^a	(126)	39.0 ^b	(86)	68.2 ^a
SCL	422	(185)	43.8 ^b	(54)	29.2 ^c	(21)	38.9 ^b
C	444	(208)	46.6 ^b	(62)	29.8 ^c	(24)	38.7 ^b

Valores con diferente letra en la misma columna difieren ^{a,b} $P < 0.01$; ^{b, c} $P < 0.05$.

*En relación a los ovocitos clivados.

**En relación a los embriones en el día 7.

De las categorías de embriones producidos en el día 7 de cultivo (**M**: mórulas; **BT**: blastocistos tempranos; **B**: blastocistos; **BE**: blastocistos expandidos; **BP**: blastocistos protruidos), se obtuvo una mayor proporción de M y BT en los tratamientos SCL (70,6%; $P < 0,01$) y C (65,1%; $P < 0,05$) que en CCL (42,0%) Figura 15. Aunque el porcentaje de blastocistos no varió entre grupos de ovarios, se alcanzó una proporción significativamente mayor de BE y BP en los ovarios CCL que en los SCL y C (28,6 versus 9,8 y 9,5% respectivamente; $P < 0,01$).

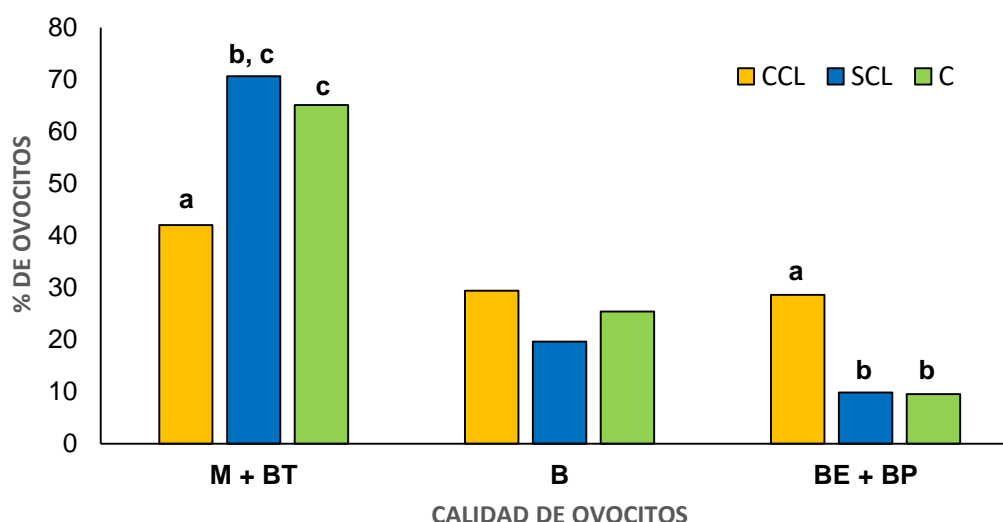


Figura 15. Estado de embriones expresados por porcentaje (%) con presencia de (M: mórulas; BT: blastocistos tempranos; B: blastocistos; BE: blastocistos expandidos; BP: blastocistos protruidos) de acuerdo a la presencia (CCL) o no (SCL, C) de un cuerpo lúteo en el ovario al momento de la colecta de ovocitos (^{a, b} $P < 0,01$, ^{b, c} $P < 0,01$).

4.1.3 Criotolerancia embrionaria

En la Tabla 3 se muestra tasa de expansión de blastocistos vitrificados a las 2 h, y de expansión y protrusión a las 24 y 48 h luego de su calentamiento. Aunque se encontraron algunas diferencias numéricas entre los grupos experimentales, estas no fueron significativas en ninguna de las variables estudiadas.

Tabla 3. Tasa de expansión de blastocistos vitrificados a las 2 horas (h), y de expansión y protrusión a las 24 y 48 h luego de su calentamiento de acuerdo a la presencia (CCL) o no (SCC, C) de un cuerpo lúteo en el ovario al momento de la colecta de ovocitos.

Tipo de ovario	Nro. de blastocistos	2 h		24 h		48 h	
		Reexpansión (n) %		Reexpansión (n) %	Protrusión (n) %	Reexpansión (n) %	Protrusión (n) %
CCL	45	(22) 48,9 ^a		(28) 62,2 ^a	(7) 15,5 ^a	(26) 57,7 ^a	(8) 17,7 ^a
SCL	13	(7) 53,8 ^a		(9) 69,2 ^a	(2) 15,4 ^a	(4) 30,7 ^a	(2) 15,4 ^a
C	12	(8) 66,6 ^a		(10) 83,3 ^a	(1) 8,3 ^a	(4) 33,3 ^a	(2) 16,6 ^a

Valores con diferente letra en la misma columna difieren

De forma similar, en los embriones descongelados tampoco se detectaron diferencias estadísticas, aunque hubo diferencias numéricas bastante notorias (Tabla 4). Por ejemplo, la tasa de reexpansión a las 2 h fue alrededor de 3,5 y 2,5 veces en CCL y SCL que en el grupo C respectivamente. Llama también la atención que la tasa de protrusión a las 24 y 48 h fue 0 en SCL y C y de 13,1 y 15,8% en CCL respectivamente. Además, se detectó una tendencia estadística ($P < 0,09$) en la reexpansión a los 24 h entre los blastocistos del grupo CCL y los de SCL y C que fue aproximadamente 2,1 y 1,95 veces menor respectivamente.

Tabla 4. Tasa de expansión de blastocistos descongelados a las 2 horas (h), y de expansión y protrusión a las 24 y 48 h luego de su descongelación de acuerdo a la presencia (CCL) o no (SCC, C) de un cuerpo lúteo en el ovario al momento de la colecta de ovocitos.

Tipo de ovario	Nro. de blastocistos	2 h		24 h		48 h	
		Reexpansión (n) %		Reexpansión (n) %	Protrusión (n) %	Reexpansión (n) %	Protrusión (n) %
CCL	38	(14) 38,9		(13) 34,2 ^a	(5) 13,1	(8) 21,1	(6) 15,8
SCL	7	(2) 28,6		(5) 71,4 ^b	(0) 0	(3) 42,8	(0) 0
C	9	(1) 11,1		(6) 66,6 ^b	(0) 0	(3) 33,3	(0) 0

Valores con diferente letra en la misma columna indican tendencia estadística ^{a, c} $P < 0,09$.

Cuando los datos de la sobrevivencia de los blastocistos calentados y descongelados se analizó en forma conjunta (Tabla 5), las diferencias numéricas entre grupos de ovarios en las variables evaluadas se hicieron menos evidentes, con la excepción de la reexpansión a las 24 horas que fue significativamente superior únicamente en los ovarios C que en los CCL ($P < 0,05$).

Tabla 5. Tasa de expansión de blastocistos criopreservados a las 2 horas (h), y de expansión y protrusión a las 24 y 48 h luego de su calentamiento/descongelación de acuerdo a la presencia (CCL) o no (SCC, C) de un cuerpo lúteo en el ovario al momento de la colecta de ovocitos.

Tipo de ovario	Nro. de blastocistos	2 h		24 h		48 h	
		Reexpansión (n) %		Reexpansión (n) %	Protrusión (n) %	Reexpansión (n) %	Protrusión (n) %
CCL	83	(36) 43,4		(41) 49,4 ^{a, b}	(12) 14,4	(34) 40,9	(14) 16,8
SCL	20	(9) 45,0		(14) 70,0 ^{b, c}	(2) 10,0	(7) 35,0	(2) 10,0
C	21	(9) 42,8		(16) 76,2 ^c	(1) 4,7	(7) 33,3	(2) 9,5

Valores con diferente letra en la misma columna difieren ^{a, c} P<0,05.

En la Tabla 6 se indica los resultados de la comparación entre grupo de ovarios de las células totales, y del número y porcentaje de células alteradas de los embriones calentados luego de la vitrificación. La doble tinción con fluorocromos permitió determinar que el número total de células y el número y porcentaje de células alteradas fue estadísticamente similar entre los tres grupos estudiados.

Tabla 6. Número de células totales, y número y proporción de células alteradas a las 48 horas luego del calentamiento de blastocistos vitrificados de acuerdo a la presencia (CCL) o no (SCC, C) de un cuerpo lúteo en el ovario al momento de la colecta de ovocitos.

Tipo de Ovario	Nro. de embriones	Células totales	Células alteradas	Proporción de células alteradas (%)
CCL	30	73,4 ± 3,6 ^a	8,9 ± 1,8 ^a	12,1 ± 2,1 ^a
SCL	7	64,1 ± 8,1 ^a	6,4 ± 4,1 ^a	9,8 ± 4,9 ^a
C	9	69,6 ± 7,3 ^a	10,9 ± 3,6 ^a	16,5 ± 4,3 ^a

Valores con diferente letra en la misma columna difieren

La evaluación de los blastocistos congelados indica que el número total de células y de células alteradas fue mayor, pero no significativo, en los ovarios CCL en comparación con los SCL y C (Tabla 7); mientras que el porcentaje de células alteradas en los tres grupos de ovarios en estudio fue muy similar (30,8 ± 4,1, 34,6 ± 7,2 y 29,2 ± 7,2; respectivamente).

Tabla 7. Número de células totales, y número y proporción de células alteradas a las 48 horas luego de la descongelación de blastocistos de acuerdo a la presencia (CCL) o no (SCC, C) de un cuerpo lúteo en el ovario al momento de la colecta de ovocitos.

Tipo de Ovario	Nro. de embriones	Células totales	Células alteradas	Proporción de células alteradas (%)
CCL	12	52,4 ± 3,6 ^a	18,6 ± 3,5 ^a	30,8 ± 4,1 ^a
SCL	3	35,2 ± 12,1 ^a	12,5 ± 6,1 ^a	34,6 ± 7,2 ^a
C	3	35,9 ± 12,1 ^a	10,5 ± 6,1 ^a	29,2 ± 7,2 ^a

Valores con diferente letra en la misma columna difieren

El análisis de los datos combinados del número de células totales, y el número y proporción de células alteradas a las 48 horas luego de la descongelación o el calentamiento de los blastocistos criopreservados indica que se cuantificaron entre 10 y 13 más células totales en los blastocistos provenientes de ovarios CCL que en los SCL y C ($P>0,05$). Además, aunque hubo cierta variación numérica en las células alteradas entre los grupos de estudio el porcentaje de estas células fue muy similar.

Tabla 8. Número de células totales, y número y proporción de células alteradas a las 48 horas luego de la descongelación o el calentamiento de blastocistos de acuerdo a la presencia (CCL) o no (SCL, C) de un cuerpo lúteo en el ovario al momento de la colecta de ovocitos.

Tipo de Ovario	Nro. de embriones	Células totales	Células alteradas	Proporción de células alteradas (%)
CCL	42	62,9 ± 4,1 ^a	13,8 ± 2,15 ^a	21,4 ± 2,5 ^a
SCL	10	49,7 ± 7,8 ^a	9,4 ± 3,9 ^a	22,2 ± 4,7 ^a
C	12	52,8 ± 7,5 ^a	10,7 ± 3,8 ^a	22,8 ± 4,5 ^a

Valores con diferente letra en la misma columna difieren

Los datos agrupados de acuerdo al tipo de criopreservación aplicada indica que la vitrificación afectó menos a los blastocistos vitrificados que a los congelados, dado que en estos se cuantificaron más blastómeras totales y menor número y porcentaje de células alteradas que cuando estas fueron congeladas ($P<0,01$).

Tabla 9. Número de células totales, y número y proporción de células alteradas a las 48 horas luego de la descongelación de blastocistos de acuerdo a la presencia (CCL) o no (SCL, C) de un cuerpo lúteo en el ovario al momento de la colecta de ovocitos.

Tipo de criopreservación	Nro. de embriones	Células totales	Células alteradas	Proporción de células alteradas (%)
Vitrificados	46	69,1 ± 4,4 ^a	8,8 ± 2,2 ^a	12,8 ± 2,6 ^a
Congelados	18	41,2 ± 7,2 ^b	13,8 ± 3,6 ^a	31,5 ± 4,3 ^b

Valores con letras diferentes en la misma columna difieren ^{a, c} $P<0,01$



4.2. Discusión

La presencia de un cuerpo lúteo en los ovarios incrementa el número de ovocitos recuperados de calidad A y B, así como la tasa de producción in vitro de embriones (4).

Según menciona Bearden y Fuquay, en las vacas Holstein a los cuatro días el CL tiene un tamaño promedio de 8 mm, siendo el promedio máximo de 20.5 mm, que se alcanza a los 15 o 16 Días del ciclo en vacas no gestantes. Posteriormente reduce su tamaño a 12.5 mm entre el día 18 a 21 luego de iniciada la Luteólisis (7) & (16).

Autores como (49) señalan que la presencia de cuerpo lúteo parece afectar el desarrollo folicular, en su trabajo realizado en ovejas, concluyen que los ovarios con presencia del CL al día 8 del ciclo estral tuvo mayor número de folículos de 1 mm comparados con los del ovario contralateral. Inclusive manifiestan que el diámetro del folículo dominante es mayor cuando existe la presencia del CL. Además, que la presencia de un CL funcional puede ejercer efectos sistémicos o locales en la población folicular de ovejas afectando la dominancia ejercida por los folículos grandes.

4.2.1 Evaluación de la calidad ovocitaria

Tanto el número como la calidad de los complejos cúmulos ovocitos (COC's), son importantes para iniciar el cultivo de embriones, pero estudios publicados por (50), (51), afirma haber recogido mayor cantidad de folículos de ovarios sin CL en bovinos, además encontró mayor número de ovocitos de categoría A y B en este ovario. El



autor afirma que este hallazgo es porque hay una restricción del desarrollo folicular, y que en ausencia de un CL no hay producción de progesterona que podría tener efectos induciendo la degeneración folicular, de esta manera la foliculogénesis puede darse con mayor éxito (50). En otro estudio se adiciono progesterona en un medio de cultivo durante la maduración de ovocitos in vitro y encontró que redujo la producción de embriones que alcanzaron al estado de blastocitos (52).

Conforme con las observaciones de los autores mencionados no se sabe con exactitud si la progesterona liberada por el cuerpo lúteo tiene un efecto local, o si a través de la circulación sanguínea afecta también el crecimiento y maduración de los ovocitos del ovario contralateral.

Trabajo similar realizado por Quezada-Casasola et al. (2018) en el que utilizaron azul Tripán (TB) y azul brillante de cresilo (BCB) para seleccionar y determinar la viabilidad y la competencia de los ovocitos, indicó que la presencia del cuerpo lúteo en el ovario afectó negativamente la expansión de las células del cúmulos. Así mismo, Bouhier (2016) señaló que los ovocitos provenientes de ovarios en etapa de proestro, con folículos en crecimiento de diámetro $\leq 8\text{mm}$, presentaron el mayor porcentaje de recuperación ovocitaria (51,44%) y de ovocitos grado 1 y 2 (66,33 %), en el momento cuando ya había culminado el período luteal. No obstante, en este estudio se recuperó una mayor proporción de ovocitos de calidad A y B (66,1%) en ovarios con CL que sin cuerpo lúteo (62,3%), coincidiendo con lo indicado por Penitente-Filho *et al.* (2015) quienes obtuvieron 2,6 veces más COCs en ovarios con CL que en aquellos sin estructura luteal.

Utilizándose otro enfoque para comparar la influencia del CL en los ovarios, un estudio en el que se colectaron ovocitos en los estadios de predominancia folicular y luteal (Reis *et al.*, 2006) se encontró que en esta última fase no solo se recuperaron mas COCs, si no también que el 63,8% de ellos eran de calidad A y B. Sin embargo, otros autores no encontraron diferencias en la proporción de COCs de calidad A y B entre ovarios en fase luteal y en fase folicular o en estado de aciclicidad (Wit *et al.*, 2000).

Según Erb, Estergreen, Gomes, Plotka & Frost (1968) el contenido de progesterona en los ovarios corresponde en un 90% al ovario que porta un CL, refleja un cambio en



la recuperación de ovocitos y tiene también un efecto intraovárico sobre la población folicular, aunque Pfeifer & Schneider (2008) no están de acuerdo con que el CL afecta el desarrollo embrionario, sin embargo, indican existe una correlación positiva entre la atresia folicular y la competencia de los ovocitos.

4.2.2. Evaluación de las tasas de clivaje y de producción de embriones

Karami Shabankareh *et al.* (2015) compararon las tasas de expansión del cumulo, de clivaje y de blastocistos a partir de COCs obtenidos de ovarios con o sin un CL. Estos autores encontraron que en ambos grupos de ovocitos las tasas de clivaje ($78,3 \pm 2,8$ y $84,2 \pm 4,7$ respectivamente) y de blastocistos ($31,4 \pm 3,4$ y $40,2 \pm 3,6$ respectivamente) fueron estadísticamente similares, aunque en ambos casos, aproximadamente 6 y 8 puntos porcentuales mayor en los ovarios sin CL que en los con CL respectivamente.

Independientemente del tipo de ovario (con y sin CL), estos autores (Karimí Shabankareh *et al.*, 2015) los clasificaron de acuerdo a si los COCs fueron colectados de folículos pequeños, medianos y grandes, y en los tres casos encontraron que de los ovarios sin CL se obtuvieron proporcionalmente mayor cantidad de blastocistos que de los ovarios con CL ($P < 0,01$).

Por el contrario, coincidiendo con nuestros resultados, Varisanga *et al.*, (1998) observaron que los ovarios con CL y sin un folículo dominante (DF) en el mismo ovario produjeron mayor número de ovocitos que experimentaron una mayor tasa de clivaje y de los cuales se derivaron mayor número de blastocistos que los obtenidos de ovarios con CL que portaban un FD o un quiste (CY) o sin ninguna de estas estructuras incluyendo un CL ($P < 0,01$).

En nuestro estudio, se utilizó un enfoque distinto al de los trabajos citados previamente, dado que se comparó el ovario con un CL de una misma vaca con el contralateral sin CL, usándose como control los ovarios de vacas sin estructura luteal en ambos ovarios. Con este enfoque experimental, se demostró que los ovocitos obtenidos de ovarios con CL tuvieron una tasa de clivaje entre 17 y 20 puntos porcentuales superior que el ovario contralateral sin CL y el control ($P < 0,01$). Además,



el porcentaje de blastocistos obtenidos fue superior en alrededor de 30% puntos porcentuales en los ovarios con CL que sin estructura luteal ($P<0,01$), independientemente de si era un ovario contralateral o un control.

Adicionalmente, los embriones que se desarrollaron a partir de ovocitos obtenidos de ovarios con CL crecieron a un ritmo mayor, dado que en el día 7 se cuantificaron proporcionalmente menos mórulas y blastocistos tempranos ($P<0,01$) y más blastocistos expandidos y protruidos ($P<0,01$) que los sin CL (SCL y C).

Los resultados (Argudo *et al.*, 2017) indican que el cuerpo lúteo no solo afecta las características morfológicas de los ovocitos, sino también su competencia para madurar (Argudo *et al.*, 2018), clivar luego de la fecundación, y desarrollarse a blastocistos (Alvarado *et al.*, 2019). Además, se comprobó que el efecto del tejido luteal podría ser a través de mecanismos locales (intraovaricos), ya que el comportamiento de los ovocitos y los embriones fue similar en los ovarios sin CL (SCL y C).

4.2.3. Evaluación de la criotolerancia embrionaria

En nuestro medio no se encontraron estudios similares en los que se haya evaluado la criotolerancia embrionaria por efecto del cuerpo lúteo. Según los hallazgos de esta investigación, el efecto beneficioso del CL sobre la competencia ovocitaria y embrionaria no se hizo evidente en la evaluación de la sobrevida de los blastocistos calentados o descongelados luego de la criopreservación, aunque en algunos casos las diferencias a favor de uno u otro tratamiento fueron considerablemente grandes. Probablemente, el número reducido de embriones criopreservados en los tratamientos SCL y C haya contribuido a que tales diferencias no sean tan evidentes.

En este estudio los embriones que sobrevivieron luego de ser calentados fue menor al indicado por Assumpção *et al.* (2008). Si bien la tasa de re-expansión a 24 horas fue considerablemente superior a lo logrado por estos autores con un medio de vitrificación similar al usado en nuestra investigación, la tasa de protrusión a las 48 horas fue bastante menor Assumpção *et al.* (2008): $37.9 \pm 5.31\%$; este estudio: 15,4 a 17,7% según el grupo experimental. Sin embargo, los valores obtenidos durante la



evaluación de la sobrevivencia de blastocistos son comparables a los indicados por Rizos, Ward, Boland, & Lonergan (2001).

Según Ochoa (2011), en el método más adecuado para la conservación de embriones bovinos es la congelación convencional en el lavado de embriones (*in-vivo*), ya que garantiza una acción más eficiente de los crioprotectores gracias a la congelación lenta, lo cual no sucede con la vitrificación ya que en esta se produce un mayor estrés y daño de las células embrionarias. Esto es corroborado por el estudio de Assumpção *et al.* (2008), quienes concluyeron que la congelación lenta a un ritmo de 5°C/minuto fue aparentemente el método más eficaz para la vitrificación de embriones, aunque otros autores han encontrado resultados contrarios (Mucci *et al.*, 2006), o similares entre ambos métodos de criopreservación (Sánchez *et al.*, 2016). Comparando estas técnicas de recolección *in-vivo* con la FIV, el método de vitrificación fue el mejor para la FIV ya que esta conserva a los embriones manteniendo sus estructuras intactas.

En esta investigación el método de vitrificación mostró diferencias numéricas en la sobrevivencia de blastocitos en los diferentes grupos estudiados. Por ejemplo, el grupo control (C) tuvo mejor comportamiento en la re-expansión a las 2 y a las 24h, mientras que una proporción mayor de blastocistos del grupo CCL re-expandieron a las 48 horas. Independientemente del grupo de ovarios, los valores de la sobrevivencia embrionaria fueron menores en los blastocistos vitrificados que en los congelados, efecto que también se hizo evidente al cuantificar las células teñidas con fluorocromos (Tabla 9), donde se aprecia que en los criopreservados mediante la congelación se cuantificaron menos células totales y mayor porcentaje de células alteradas.

Oriundo Núñez (2018) mencionaron que con el método de congelación (n=52) obtuvieron 48 embriones (93.1%), mientras que con la vitrificación (n=49) consiguieron 38 embriones (77.5%). Asimismo, con el método de congelación se lograron mejores tasas de re-expansión a las 3 horas que con la vitrificación: 43,7 y 26,5% respectivamente, aunque esta diferencia no fue significativa, coincidiendo con el estudio de Wurth, Reinders, Rall, & Kruip (1994) quienes indicaron que el 23% (n=85) de embriones vitrificados y el 14% (n=35) de embriones congelados produjeron preñez ($P>0,05$).



En el estudio de Villamediana (2011) se utilizaron pajuelas estiradas cerradas (CPS) para conservar embriones de vacas mestizas ($n=49$) que tras el enfriamiento se recuperaron 47 embriones (97%) y de ellos 23 embriones (~50%) re-expandieron a las 24 horas. Además, la cuantificación de las blastómeras resultó que el porcentaje de células alteradas fue de 0,93% en embriones frescos y un 23.2% en embriones vitrificados. En el estudio presente, un 12,8 % de las células de los blastocistos vitrificados estaba alterada, mientras que en los congelados este valor se incrementó a 31,5% ($P<0,01$).

En nuestro estudio la sobrevida de embriones no tubo diferencia estadística coincidiendo con los resultados de (63) quienes no obtuvieron diferencia entre embriones congelados y vitrificados; sin embargo, el uso de tinción triple con fluorocromos demostró que algunas células con membrana intacta se tiñeron demostrando así que los vitrificados tuvieron un mayor porcentaje de células vivas.



5. CONCLUSIONES

En general, se comprobó que la presencia de un cuerpo lúteo en uno de los ovarios tuvo un efecto local y solamente afectó a los ovocitos y embriones provenientes de ese ovario. De esta manera, en los ovarios ipsilaterales (CCL) se obtuvo una mayor tasa de clivaje que en los ovarios contralaterales (SCL) y controles (C).

Además, en el grupo CCL se obtuvieron más embriones totales y blastocistos en el día 7 de cultivo, que se desarrollaron más rápidamente que en los ovarios SCL y C, dado que una menor proporción de ellos estaban en estadio de mórula y blastocistos tempranos y una mayor proporción en estadio de blastocistos expandidos y protruidos.

La presencia de un cuerpo lúteo activo en el ovario al momento de recuperarse los ovocitos no tuvo efecto en la subsecuente capacidad de los embriones para tolerar la criopreservación.

Independientemente del tratamiento, la comparación de ambos métodos de criopreservación indicó que con la vitrificación los embriones *in vitro* sufren menos daños en su estructura.



6. BIBLIOGRAFÍA

1. Palma G. Biotecnología de la reproducción ciencia, tecnología y sociedad. In Argentina; 2008. p. 1–49. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/281841588>
2. Machatková M, Jokešová E, Petelíková J, Dvořáček V. Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology* [Internet]. 1996 Mar 1 [cited 2019 Apr 30];45(4):801–10. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X9600009X>
3. Reis A, Staines ME, Watt RG, Dolman DF, McEvoy TG. Embryo production using defined oocyte maturation and zygote culture media following repeated ovum pick-up (OPU) from FSH-stimulated Simmental heifers. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2002 Aug 15 [cited 2019 Feb 5];72(3–4):137–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12137977>
4. Reis A, Metelo R, Santos P, Silva FM da, Silva FM da. Efeito da estrutura ovárica e da idade de bovinos da raça Holstein Friesian na quantidade e qualidade de ovócitos e de embriões produzidos in vitro. *Brazilian J Vet Res Anim Sci* [Internet]. 2006 Oct 1 [cited 2019 Feb 7];43(5):629. Available from: <http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26571>
5. Manjunatha BM, Gupta PSP, Ravindra JP, Devaraj M, Ramesh HS, Nandi S. In vitro developmental competence of buffalo oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology*. 2007;68(6):882–8.
6. Karami Shabankareh H, Shahsavari MH, Hajarian H, Moghaddam G. In vitro developmental competence of bovine oocytes: Effect of corpus luteum and follicle size. *Iran J Reprod Med* [Internet]. 2015 Oct [cited 2019 Feb 12];13(10):615–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26644789>
7. Bearden HJ (Henry J, Fuquay JW. Reproducción animal aplicada [Internet]. El Manual Moderno; 1982 [cited 2019 Feb 7]. Available from:



https://books.google.com.ec/books?id=JMD_OwAACAAJ&dq=reproduccion+animal+aplicada%2Bbearden+y+junkie&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjZifDG74bUAhVG4CYKHSNmADQQ6AEILTAB

8. Dejarnette M, Nebel R. Anatomía y Fisiología de la Reproducción Bovina [Internet]. USA; 2016 [cited 2019 Feb 7]. Available from: http://www.selectsires.com/dairy/SpainResources/reproductive_anatomy_spanish.pdf?version=20180803
9. Forde N, Beltman ME, Lonergan P, Diskin M, Roche JF, Crowe MA. Oestrous cycles in Bos taurus cattle. Anim Reprod Sci [Internet]. 2011 Apr 1 [cited 2019 Feb 5];124(3–4):163–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432010004094?via%3Dihub>
10. Hafez ES. Reproducción e inseminación artificial [Internet]. 1996. p. 519. Available from: <https://es.scribd.com/doc/150197543/hafez-reproduccion-e-inseminacion-artificial-pdf>
11. Rippe CA. El ciclo estral [Internet]. Minneapolis, MN; 2009 [cited 2019 Feb 9]. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Christian_Rippe2/publication/265116863_EL_CICLO ESTRAL/links/55143dd70cf2eda0df308475/EL-CICLO-ESTRAL.pdf
12. Iñiguez F. Manipulación del Ciclo Estral en Ganado Bovino. - PDF [Internet]. 2010 [cited 2019 Feb 11]. p. 2. Available from: <https://docplayer.es/5134327-Manipulacion-del-ciclo-estral-en-ganado-bovino.html>
13. Sintex. Fisiología reproductiva del bovino [Internet]. Argentina; 2005 [cited 2019 Feb 9]. Available from: www.produccion-animal.com.ar
14. B.Hafez EH. HAFEZ - reproduccion e inseminacion artificial.pdf [Internet]. 2002 [cited 2019 Feb 21]. Available from: <https://es.scribd.com/doc/150197543/HAFEZ-REPRODUCCION-E-INSEMINACION-ARTIFICIAL-pdf>



15. Ireland JJ, Murphee RL, Coulson PB. Accuracy of Predicting Stages of Bovine Estrous Cycle by Gross Appearance of the Corpus Luteum 1. J Dairy Sci [Internet]. 1980 [cited 2019 Feb 9]; Available from: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(80\)82901-8/pdf](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(80)82901-8/pdf)
16. Pesántez Calle EDR. Relación entre el tamaño del folículo preovulatorio, diámetro del cuerpo lúteo y niveles de progesterona en el ganado bovino de la raza criolla [Internet]. 2015 [cited 2019 Feb 11]. Available from: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/22251/1/TESIS.pdf.pdf>
17. Yunga Ayavaca ES. Efecto de la hormona gonadotropina corionica equina (eCG) en la maduración folicular en bovinos con su cria al pie. 2013 [cited 2019 Feb 11]; Available from: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/3413>
18. Urroz C. Elementos de anatomía y fisiología animal [Internet]. UNED; 1991 [cited 2019 Feb 11]. Available from: https://books.google.com.ec/books/about/Elementos_de_Anatomía_Y_Fisiología_Ani.html?id=K25RmJ28OCQC
19. Drummond AE. The role of steroids in follicular growth. Reprod Biol Endocrinol [Internet]. 2006 Apr 10 [cited 2019 Feb 11];4(1):16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16603089>
20. Fernández Tubino Á. Dinámica folicular: funcionamiento y regulación [Internet]. 2003 [cited 2019 Feb 11]. Available from: www.produccion-animal.com.ar
21. Motta Delgado PA, Ramos Cuéllar N, Gonzáles Sánchez CM, Castro Rojas EC. Dinámica folicular en la vida reproductiva de la hembra bovina Follicular dynamics in the reproductive life of female livestock [Internet]. Colombia; 2011 [cited 2019 Feb 11]. Available from: <http://vip.ucaldas.edu.co/vetzootec/downloads/v5n2a08.pdf>
22. Garcés J, Vélez MP, Vásquez N, Agudelo B, Maldonado JG. Revista colombiana de ciencias pecuarias [Internet]. Vol. 12, Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Colvesa; 1999 [cited 2019 Feb 11]. 138-144 p. Available from: <https://aprendeonline.udea.edu.co/revistas/index.php/rccp/article/view/323712>



23. Hafez B, Hafez ESE (Elsayed SE. Reproduction in farm animals [Internet]. 2002 [cited 2019 Feb 11]. 509 p. Available from: <https://www.wiley.com/en-us/Reproduction+in+Farm+Animals%2C+7th+Edition-p-9781118710289>
24. Olivera M, Tarazona A, Ruiz T, Giraldo C. Vías implicadas en la luteólisis bovina [Internet]. 2007 [cited 2019 Feb 11]. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v20n3/v20n3a17.pdf>
25. Smiths MF, Mcintosh EW, Smith GW. Mechanisms Associated with Corpus Luteum Development1f2 [Internet]. Columbia, Mis; 1994 [cited 2019 Apr 30]. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/e417/e21b5714da5636f75365a199ade623bb60e0.pdf>
26. Hernández J, Luis C, Quintero AZ. Función del cuerpo lúteo y muerte embrionaria en rumiantes [Internet]. México; 1998 [cited 2019 Feb 11]. Available from: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol8/CVv8c1.pdf>
27. Meidan R. The Life Cycle of the Corpus Luteum. Rehovot , Jerusalem , Israel; 2017. 21-115 p.
28. Fernando Uribe-Velásquez L, Henry Osorio J, Correa-Orozco A, Asociado P. El cuerpo lúteo: una visión inmunológica. 2011 [cited 2019 Apr 30];10:88–91. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v10n2/v10n2a09.pdf>
29. Tomac J, Cekinović D, Arapović J. Periodicum biologorum. [Internet]. Vol. 113, Periodicum biologorum. [Hrvatsko prirodoslovno društvo]; 2011 [cited 2019 Feb 11]. 43-49 p. Available from: <https://hrcak.srce.hr/67235>
30. Ramírez Ilgesia LN. El uso del radioinmunoanálisis (RIA) para el mejoramiento de la eficiencia reproductiva [Internet]. 2001 [cited 2019 Jan 12]. p. 340–3. Available from: https://www.researchgate.net/publication/293569448_el_uso_del_radioinmunoanalisis_ria_para_el_mejoramiento_de_la_eficiencia_reproducctiva
31. Berg U, Reichenbach HD. Producción in vitro de embriones [Internet]. 1992 [cited 2019 Feb 11]. Available from: www.reprobiotec.com



32. Pelaez V. Producción in vitro de embriones bovinos. 2011;1–86. Available from: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/3053>
33. Rodríguez, P; Jiménez C. Criopreservación de embriones bovinos producidos. 2011;58(li):107–19. Available from: <https://doi.org/10.15446/rfmvz>
34. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Primavera MR, Rocchetta G, Ciotti PM, et al. Technical aspects of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;169(1–2):39–42.
35. Yavin S, Arav A. Measurement of essential physical properties of Vitriification solution. 2007; Available from: 10.1016/j.theriogenology.2006.09.029
36. Ungerfeld R, Dago AL, Rubianes E, Forsberg M. Response of anestrous ewes to the ram effect after follicular wave synchronization with a single dose of estradiol-17beta. *Reprod Nutr Dev.* 2004;44(6):89–98.
37. Silva ME, Berland MA. Vitriificación de blastocitos bovinos producidos in vitro con el método Open Pulled Straw (OPS): Primer reporte*. *Arch Med Vet.* 2004 Jan;36(1):79–85.
38. Gordon IR. Laboratory Production of Cattle Embryos [Internet]. 2003; 2003. Available from: [https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=QO-KITSjqCUC&oi=fnd&pg=PR20&dq=Gordon,+I.+R.+\(2003\).+Laboratory+Production+of+Cattle+Embryos.+2003&ots=v--FfIMqjt&sig=534aBZBfCnivwKP8q8_3BRn3TgM](https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=QO-KITSjqCUC&oi=fnd&pg=PR20&dq=Gordon,+I.+R.+(2003).+Laboratory+Production+of+Cattle+Embryos.+2003&ots=v--FfIMqjt&sig=534aBZBfCnivwKP8q8_3BRn3TgM)
39. Sanches BV, Lunardelli PA, Tannura JH, Cardoso L, Colombo MH, Gaitkoski D, et al. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. *Theriogenology.* 2016;
40. Lliguisupa Landin VM. Evaluación de la calidad de ovocitos bovinos con la técnica de la vitriificación en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la Universidad Técnica de Cotopaxi. 2015 [cited 2019 Feb 21]; Available from: <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/2886>
41. Smith GD, Takayama S. Cryopreservation and microfluidics: a focus on the



- oocyte. *Reprod Fertil Dev* [Internet]. 2019 Jan 21 [cited 2019 Feb 21];31(1):93. Available from: <http://www.publish.csiro.au/?paper=RD18326>
42. Vásquez E. M, Cueva M. S, Cordero R. A, Gonzales C. ML, Huanca L. W. Evaluación de dos métodos de criopreservación de embriones de llamas sobre las tasas de supervivencia in vivo e in vitro. *Rev Investig Vet del Perú*. 2011;22(3):190–8.
 43. Mogas T, Valle C. Update on the vitrification of bovine oocytes and in vitro - produced embryos. 2019;105–17. Available from: <https://doi.org/10.1071/RD18345>
 44. Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. 2003 [cited 2019 Feb 21]; Available from: [https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=QO-KITSjqCUC&oi=fnd&pg=PR20&dq=Gordon,+I.+R.+\(2003\).+Laboratory+Production+of+Cattle+Embryos.+2003&ots=v--FfIMqjt&sig=534aBZBfCnivwKP8q8_3BRn3TgM](https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=QO-KITSjqCUC&oi=fnd&pg=PR20&dq=Gordon,+I.+R.+(2003).+Laboratory+Production+of+Cattle+Embryos.+2003&ots=v--FfIMqjt&sig=534aBZBfCnivwKP8q8_3BRn3TgM)
 45. Abón Escalona LV. Calentamiento en paso único de embriones bovinos producidos in vitro y vitrificados [Internet]. 2012 [cited 2019 Feb 21]. Available from: <https://doi.org/http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/4002/1/TFM>. Calentamiento en paso único de embriones bovinos producidos in vitro y vitrificados
 46. Statistical Analysis Systems Institute. SAS/OR ® 12.2 User's Guide Mathematical Programming SAS ® Documentation [Internet]. 2012 [cited 2019 Feb 12]. Available from: <http://support.sas.com/documentation/cdl/en/ormpug/66183/PDF/default/ormpug.pdf>
 47. Samaniego JX. “Evaluación de ovocitos recuperados por Ovum Pick Up (OPU) en tiempos diferentes, luego de la estimulación ovárica con FSH-LH (Pluset®) en vaquillas Criollas” [Internet]. Cuenca, Ec; 2017 [cited 2019 Apr 30]. Available from: [http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/27820/1/Trabajo de](http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/27820/1/Trabajo%20de%20tesis%20de%20JX%20Samaniego.pdf)



Titulación.pdf

48. López Cardona ÁP, Gómez Morales NA, Morales Tarazona AM, Olivera M. Capítulo 5 Procedimientos para producción de embriones bovinos in vitro. Colombia; 2014.
49. Uribe Velásquez LF, Orozco Correa A, Osorio JH. Características del crecimiento folicular ovárico durante el ciclo estral en ovejas. 2009 [cited 2019 Feb 11]; Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v8n1/v8n1a15.pdf>
50. Mamy K, Atiqah N, Ariani N. Effect of ovarian types and collection techniques on the number of follicles and the quality of cumulus-oocyte-complexes in cow. Bangladesh J Anim Sci [Internet]. 2017 Jan 9 [cited 2019 Feb 11];45(3):10–6. Available from: <https://www.banglajol.info/index.php/BJAS/article/view/31034>
51. Khandoker M, Atiqah NF, Ariani N. Effect of ovarian types and collection techniques on the number of follicles and the quality of cumulus-oocyte-complexes in cow. 2016;10–6.
52. Lonergan P. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. Theriogenology [Internet]. 2011 Dec 1 [cited 2019 Feb 11];76(9):1594–601. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X11002846?via%3Dihub>
53. Quezada-Casasola A, Martínez-Armendáriz KE, Itzá-Ortiz MF, Escárcega-Ávila AM, Pérez-Eguía E, Filipiak Y, et al. Effect of presence of corpora lutea on cumulus expansion of in vitro matured bovine oocytes selected by trypan blue and brilliant cresyl blue tests. J Appl Anim Res [Internet]. 2018;46(1):967–72. Available from: <https://doi.org/10.1080/09712119.2018.1440566>
54. Bouhier M. Categorización de estructuras ováricas: relación con el porcentaje de recuperación ovocitaria, maduración y desarrollo embrionario in vitro en la especie bovina [Internet]. 2016 [cited 2019 Feb 17]. Available from: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/categorizacion-estructuras->



ovaricas-especie-bovina.pdf

55. Erb RE, Estergreen VL, Gomes WR. Progesterin Content of Ovaries and the Effect on Assessment of Luteal Activity in the Bovine. J Dairy Sci [Internet]. 51(9):411–5. Available from: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(68\)86999-1](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(68)86999-1)
56. Pfeifer LFM, Schneider A. Factors that affect the in vitro production of bovine embryos. 2008;55(53):109–20. Available from: <https://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/rccp/article/view/324261/20781435>
57. M.D. Varisanga, C. Sumantri, M. Murakami MF and TS. Theriogenology. 1998;(98):1015–23.
58. Assumpção MEOA, Milazzotto MP, Simões R, Nicacio AC, Mendes CM, Mello MRB, et al. In vitro survival of in vitro-produced bovine embryos cryopreserved by slow freezing, fast freezing and vitrification. Anim Reprod Anim Reprod. 2008;44(353):116–20.
59. Ochoa T. Criopreservacion de embriones bovinos. Tesis De Grado [Internet]. 2011;1–91. Available from: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/3055>
60. Oriundo Núñez KP. Sobrevivencia de blastocistos bovinos in vitro en dos métodos de criopreservación. Univ Nac Agrar La Molina [Internet]. 2018 [cited 2019 Feb 21]; Available from: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/3604>
61. Wurth YA, Reinders JMC, Rall WF, Kruip THAM. Developmental potential of in vitro produced bovine embryos following cryopreservation and single-embryo transfer. Theriogenology [Internet]. 1994 Dec 1 [cited 2019 Feb 20];42(8):1275–84. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X9490247G>
62. Villamediana P. Sobrevivencia de embriones bovinos mestizos (bos taurus x bos indicus) producidos in vitro tras su vitrificación en pajuelas estiradas cerradas. Repos académico, serbiluz. 2011;6–9.

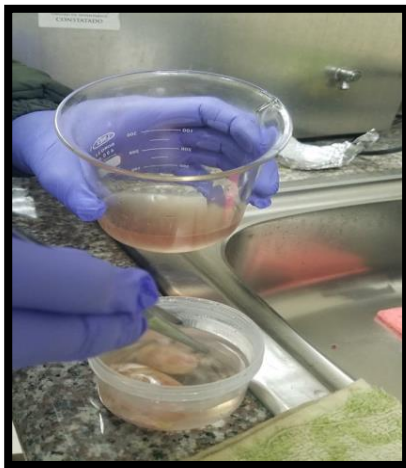


63. Kaidi S, Bernard S, Lambert P, Massip A, Dessy F, Donnay I. Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced in vitro. *Biol Reprod.* 2001;65:1127–34.

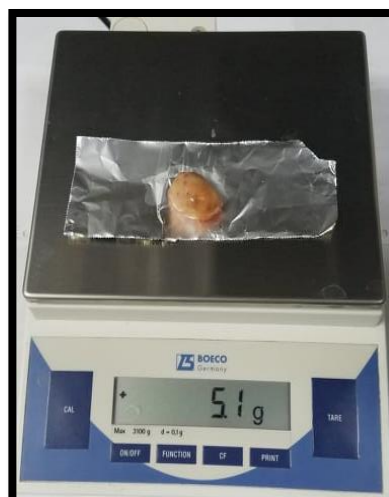
7. ANEXOS



Anexo 1: Recolección de ovarios bovinos en el camal municipal de Cuenca.



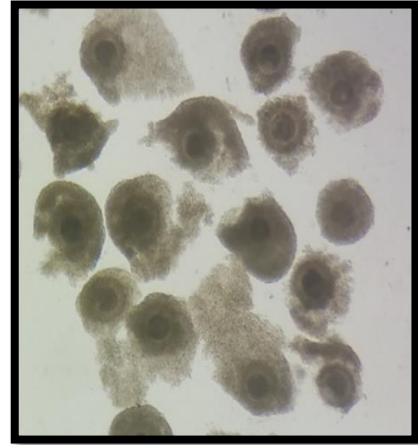
Anexo 2: Lavado de ovarios con SF y ovarios con presencia de CL



Anexo 3: Ovarios con CL y sin CL (control); pesaje del ovario



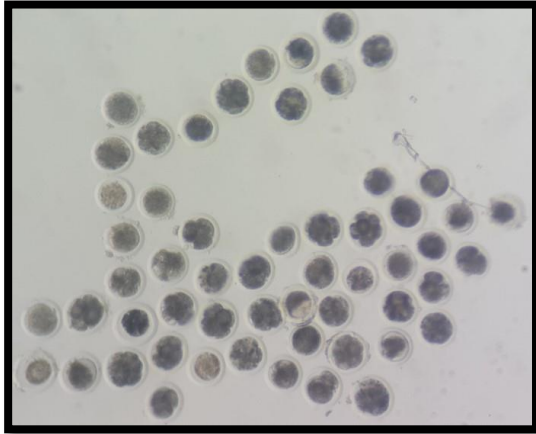
Anexo 4: Punción de folículos y pesaje del cuerpo lúteo



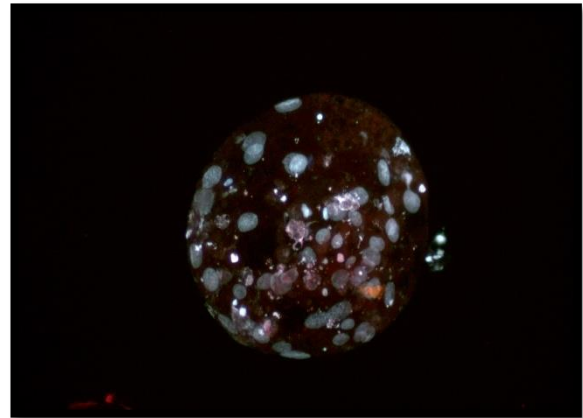
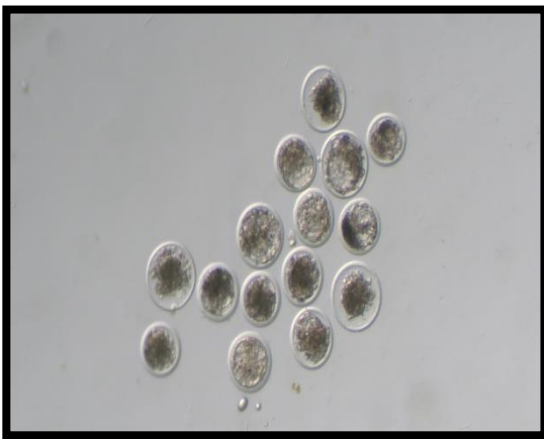
Anexo 5: Búsqueda de ovocitos y categoría de ovocitos



Anexo 6: Columnas de Percoll para la FIV y denudado de ovocitos



Anexo 7: Clivaje de embriones y vitrificación de embriones



Anexo 8: Embriones desvitrificados grupo con CCL y tinción con fluorocromos